

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE FILAMENTOS Y
ESTRUCTURAS MEMBRANOSAS INDUCIDAS POR LA
LIBERACIÓN DEL VIRUS BUNYAMWERA EN CÉLULAS DE
MAMÍFERO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Laura Sanz Sánchez

Bajo la dirección de la doctora
Cristina Risco Ortiz

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-695-0769-8

©Laura Sanz Sánchez, 2011



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Caracterización estructural de filamentos y estructuras membranosas inducidas por la liberación del virus Bunyamwera en células de mamífero

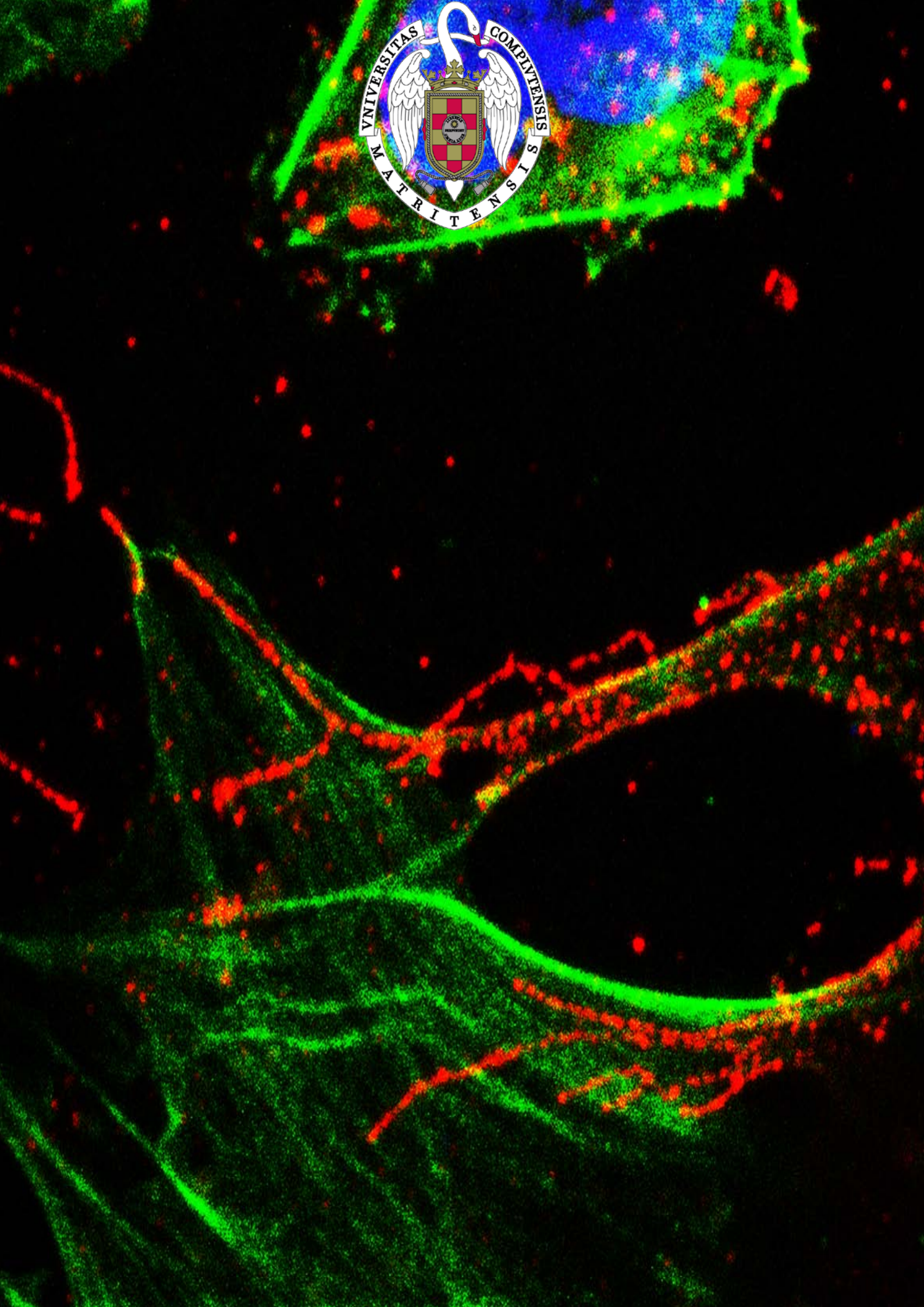
TESIS DOCTORAL

LAURA SANZ SÁNCHEZ
MADRID, 2011



CENTRO
NACIONAL DE
BIOTECNOLOGÍA





Caracterización estructural de filamentos y estructuras membranosas inducidas por la liberación del virus Bunyamwera en células de mamífero

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Ciencias Biológicas por:

D^a Laura Sanz Sánchez

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de CC. Biológicas

Universidad Complutense de Madrid,

Abril, 2011

VºBº del Director de la Tesis Doctoral

Dra. D^a Cristina Risco Ortiz



CENTRO
NACIONAL DE
BIOTECNOLOGIA



Índice

Índice.....	i
Abreviaturas.....	xi
Resumen del trabajo.....	xv
Objetivos.....	xix
Introducción.....	1
1. Virus.....	3
1.1. Virus cuyo genoma es ARN.....	4
2. Familia <i>Bunyaviridae</i>	5
2.1. <i>Orthobunyavirus</i>	9
3. Virus Bunyamwera.....	9
3.1. Morfología del VBUN.....	10
3.2. Genoma y proteínas.....	11
3.3. Ciclo vital del VBUN.....	14
4. Factorías virales.....	17
5. Liberación de virus en cultivos celulares.....	19
6. Transmisión viral célula-célula.....	20
7. Estructuras adhesivas en seres vivos.....	21
7.1. Animales con diseños estructurales únicos de adhesividad.....	21
8. Contacto célula-sustrato.....	22
9. Contactos célula-célula y célula-matriz extracelular.....	23
10. Alteración de proteínas relacionadas con la adhesividad celular durante las infecciones virales.....	24
11. Citoesqueleto celular e infecciones virales.....	25
12. Alteración de la membrana plasmática durante infecciones virales.....	25
Materiales y métodos.....	27
1. Células y virus.....	29
2. Sondas, anticuerpos, tampones y fijadores para microscopía.....	29
3. Titulación del virus VBUN.....	32
3.1. Células BHK-21.....	32
3.2. Células MRC-5.....	32
3.3. Células HEp-2.....	33
4. Infección del virus VBUN.....	33
4.1. Células BHK-21.....	33

4.2. Células MRC-5.	33
4.3. Células HEp-2.....	33
5. Incorporación de Bromouridina.	33
6. Marcaje de autofagosomas y tratamiento con 3-metiladenina (3-MeA). .	34
7. Tratamientos con drogas depolimerizantes de actina.	34
8. Preparación de muestras para microscopía óptica de fluorescencia.	34
8.1. Inmunofluorescencia.....	34
8.2. Sondas en célula viva.	35
9. Reconstrucción tridimensional a partir de microscopía confocal.....	36
10. Estudio de monocapas orientadas e infectadas para MET.....	36
10.1. Inclusión en epoxi-resina EML-812.....	37
10.2. Obtención de cortes ultrafinos seriados para MET.	37
10.3. Seguimiento de los cortes de la serie en la rejilla en el MET.	37
10.4. Inclusión de células en epoxi-resina EML-812 sin eliminar el medio de cultivo.....	37
10.5. Inclusión en resina acrílica LR-White TM	38
10.6. Obtención de cortes ultrafinos de muestras incluidas en resina acrílica LR-White TM	38
10.7. Preparación de rejillas para microscopía electrónica.....	39
11. Reconstrucción 3D de cortes seriados.....	39
12. Obtención de virus intracelulares procedentes de células HEp-2.....	40
13. Desarrollo de protocolos de microscopía correlativa.	40
14. Análisis Bioquímicos.	41
14.1. Western-blot.	41
15. Ensayo de adhesividad.	42
Resultados	43
1. Resultados en células de hámster BHK-21 infectadas por el VBUN.	45
1.1. Caracterización de estructuras membranosas inducidas por la infección.....	45
1.2. Caracterización de las estructuras membranosas a través de técnicas de microscopía óptica de fluorescencia.	50
1.3. Detección de proteínas del citoesqueleto por Western blot.	59
2. Infección del VBUN en células humanas MRC-5.....	60
2.1. Caracterización de la infección del VBUN en células MRC-5.	60
2.2. Descripción de estructuras membranosas mediante MET.....	68
2.3. Estudio de los cambios en la membrana plasmática de células MRC-5 infectadas con el VBUN mediante microscopía de fluorescencia.....	73

2.4. Detección de proteínas del citoesqueleto y de la adhesión celular mediante Western blot.....	75
3. Resultados de la infección del VBUN en células humanas HEp-2.	75
3.1. Caracterización de la infección del virus VBUN en HEp-2.	75
3.2. Caracterización ultraestructural de la infección del VBUN en células HEp-2 mediante MET y búsqueda de estructuras membranosas.	77
3.3. Estudio por microscopía óptica de fluorescencia del contorno celular de células HEp-2 utilizando la sonda WGA.	84
3.4. Detección de proteínas implicadas en adhesión celular en células HEp-2 por Western blot.	88
4. Ensayo de adhesividad en células control e infectadas con VBUN.	89
5. Liberación del VBUN en células BHK-21 y MRC-5. Tratamiento con drogas de depolimerización de actina.....	92
5.1. Liberación de nuevos virus en células BHK-21 y MRC-5.....	93
5.2. Inmunomarcajes en resina LR-White TM	94
5.3. Estudio de los filamentos de actina y de la liberación de nuevos virus por técnicas de inmunofluorescencia.	95
Discusión	101
Conclusiones	111
Bibliografía	115

Este trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Estructura Celular del Departamento de Estructura de Macromoléculas del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) con una beca de FPU AP-20050265 (Formación Profesorado Universitario) asociada al laboratorio de la Dra. D^a. Cristina Risco Ortiz (CNB-CSIC) y un contrato de Titulado Medio de Actividades Técnicas y Científicas y Profesionales, asociado al Proyecto “(BIO2009-07255). Replicación y morfogénesis en factorías virales: un modelo para estudiar la arquitectura celular con resolución molecular”.

Investigador principal:
Dra. D^a Cristina Risco Ortiz.



CENTRO
NACIONAL DE
BIOTECNOLOGIA



A mi familia y amigos.

A mis queridos padres, Luis y Boni.
A mi hermano Mario y su esposa Begoña.
A mi dulce y querido Carlos.

... sin vosotros, este trabajo
no habría sido posible.

Gracias por vuestro
apoyo incondicional siempre.

Bienvenido, Dani...

Son muchas las personas a las que tengo que agradecer el apoyo, esfuerzo y trabajo dedicados en esta tesis. En especial a mi directora, Dra. D^a Cristina Risco Ortiz, por haberme dado la oportunidad de realizarla en su laboratorio y haberme enseñado, guiado y aconsejado durante estos años. Me gustaría dar las gracias a todas las personas que formaron parte del laboratorio de Estructura Celular durante estos años (2007-2011).

En segundo lugar me gustaría agradecer el apoyo recibido por parte del Servicio de Microscopía Confocal del CNB, CSIC, Madrid, encabezado por Sylvia Gutiérrez (gracias por tus maravillosos consejos), Pepe Coll, Susana Hernández y Ana C. García, no sólo por las fotos y el tratamiento de las imágenes, sino por todas las veces que me habéis escuchado y echado un cable. Gracias por realizar un trabajo impecable con mis muestras. Al Servicio de Microscopía Electrónica del CNB, CSIC, dirigido por Cristina Patiño y a todos los técnicos que durante estos años estuvieron en el servicio.

A todos los investigadores que desinteresadamente me ayudaron o me proporcionaron anticuerpos o productos necesarios para el desarrollo de esta tesis: grupo de Dra. D^a Inés Antón (CNB, CSIC, Madrid), en especial a Ana Franco, Inmaculada Bañón, Chiara Ragazzini y Esther García. Grupo de Dr. Alberto Fraile (CNB, CSIC, Madrid) en especial a María Victoria Cepeda, por su apoyo y su amistad estos años; grupo de Dra. D^a Carmen Rivas (CNB, CSIC, Madrid), en especial a Laura, Pedro, Jose y Michella por alegrarme las largas horas en cultivos y hacerme sentir arropada cuando más lo he necesitado; grupo de Dr. Isidoro Martínez (Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid) y grupo de Dr. D. Luis Antón (CBM, CSIC, Madrid). A Ana Risco (grupo de Dra. D^a Ana Cuenda, CNB, CSIC, Madrid), por enseñarme que en la vida, la ayuda a los demás debe ser siempre desinteresada.

A mis queridos amigos del CIB, Ruth, Sonia, Mon, Nacho, Marian, Rubén y Benet, porque parte de esta tesis también ha sido gracias a vuestro pequeño empujón, gracias al cual hoy estoy escribiendo estas líneas.

Especialmente quisiera agradecer esta tesis a unos cuantos amigos que sin ellos, sobre todo en la última etapa, no habría sido capaz de terminarla: Loli (por muchísimas cosas pero sobre todo por ayudarme a corregir la tesis, por los cafés en tu casa y tu maravillosa compañía) Javi “Calvin”, (por los mejores consejos que he recibido en estos últimos años), Tess y Jorge (os quiero, sólo puedo decir eso), Sara (mi fiel “hermana”), a todo el resto de biólogos (Maken, Alba, Bea, Luis) y no biólogos (Raquel, mi “enfermera” favorita).

Finalmente a la familia Ferreira-del Castillo (Carlos, Virginia y Álex), gracias por ser mis segundos padres y mi segundo hermano, os quiero.

Por último, a mis adorados abuelos Siro, Concha, Crescencia y Santiago, porque estuvisteis, estáis y estaréis muy presentes en todo lo que haga. A todos mis tíos y primos, gracias a todos vosotros por los últimos empujoncitos...

Abreviaturas

- ADN, Ácido desoxirribonucleico (del inglés, “deoxyribonucleic acid”).
- ARN, Ácido ribonucleico (del inglés “ribonucleic acid”).
- ARNc, ARN complementario.
- ARNm, ARN mensajero.
- 3D, Tridimensional.
- AU, Acetato de uranilo.
- BHK-21, Fibroblastos de riñón de hámster (del inglés, “baby hamster kidney”).
- BrU, Bromouridina.
- BSA, Albúmina de Suero bovino, (del inglés “albumine serum bovine”).
- CCD, dispositivo de carga acoplada (del inglés “charge-coupled device”).
- DAPI, del inglés “4',6-Diamidino-2-Phenylindole”.
- DIC, (del inglés “differential interference contrast microscopy”).
- ds-ADN, ADN de doble cadena.
- dsARN-RT, virus ADN de doble cadena que replican gracias a una hebra sencilla de ARN.
- DMEM, Medio de Eagle modificado por Dulbecco (del inglés “Dulbecco’s modified Eagle’s medium”).
- dsARN, ARN de doble cadena (del inglés “double-stranded RNA”).
- DOPA, 3-4-dihidroxi-fenilalanina catecol.
- EDTA, Ácido etilendiaminetetracético (del inglés “ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate”).
- EGTA, Ácido tetra acético del glicol de etileno.
- FBS, Suero fetal bovino (del inglés “fetal bovine serum”).
- GFP, Proteína verde fluorescente (del inglés “green fluorescent protein”).
- HEPES, del inglés “((4-(2-hydroxyethyl) -1-piperzineethanesulfonic acid)”.
- HEp-2, Células epiteliales procedente de laringe humana. Las siglas HEp provienen del inglés “Human Laryngeal Tumor Cells”.
- MDC, Monodansilcadaverina.
- MDCK-1, Células de riñón de perro (del inglés “Madin-Darby canine kidney”).
- MES, 2-(N-morpholino) (del inglés “ethanesulfonic acid”).
- MET, Microscopía Electrónica de Transmisión.
- MOI, Unidad de multiplicidad de infección (del inglés “multiplicity of infection”).
- MRC-5, Células tipo fibroblastos de pulmón fetal (del inglés “Medical Research Council”).
- N, Nucleocápsida del VBUN.
- nm, Nanómetro.
- ORF, Pauta abierta de lectura (del inglés “open reading frame”).
- PFA, Paraformaldehído.
- RIPA, del inglés “Radio-Immunoprecipitation Assay”.
- RE, Retículo endoplásmico.
- RER, Retículo endoplásmico rugoso.
- RNP, Ribonucleoproteína.
- UFP, Unida formadora de placa de lisis.
- VBUN, Virus Bunyamwera.
- WGA, Aglutinina de germen de trigo (del inglés “Wheat germ agglutinin”).

Resumen del trabajo

La utilización de cortes orientados en monocapas infectadas con el virus Bunyamwera (VBUN) y procesadas por microscopía electrónica de transmisión (MET) permitió la identificación de nuevas estructuras membranosas organizadas en multilamelas cuyo origen y función eran desconocidos. Su diseño estructural y su situación basal en la célula sugirieron una función de adhesión. En los estudios recogidos en la presente memoria se obtuvieron, también datos nuevos en cuanto a la liberación y propagación del VBUN.

La aplicación de técnicas de vídeo-microscopía de célula viva y microscopía correlativa, han permitido realizar un estudio detallado de las regiones basales de las células infectadas. Igualmente, se realizaron ensayos funcionales y tratamientos con drogas que permitieron asignar una función adhesiva a las nuevas estructuras membranosas y una posible participación de los haces de filamentos extracelulares en la liberación y propagación de los nuevos virus infectivos.

Objetivos

El estudio de monocapas infectadas de células BHK-21 con cortes orientados permitió comprobar que la liberación de VBUN ocurre en zonas basales de la célula. En estas zonas basales aparecieron nuevas estructuras membranosas y filamentos extracelulares no descritos en la Bibliografía.

Los objetivos principales de esta tesis han sido:

- I. Caracterización de las nuevas estructuras membranosas inducidas por VBUN en regiones basales de células BHK-21 mediante técnicas de microscopía electrónica 2D y 3D.
- II. Búsqueda de factores celulares y virales relacionados con la formación y mantenimiento de estas estructuras.
- III. Búsqueda de estructuras membranosas en otras líneas celulares susceptibles al VBUN y en las que el virus se libera por regiones basales o apicales.
- IV. Estudio de la función de las estructuras.
- V. Desarrollo de métodos de microscopía de célula viva y microscopía correlativa para estudios dinámicos de la biogénesis de las estructuras membranosas inducidas por el virus.
- VI. Caracterización estructural de filamentos proteicos extracelulares asociados a la liberación de VBUN en regiones basales de las células infectadas.

La tesis doctoral que presenta Dña. Laura Sanz Sánchez con título “Caracterización estructural de filamentos y estructuras membranosas inducidas por la liberación del virus Bunyamwera en células de mamífero” para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid se ha centrado en el estudio de la liberación del virus Bunyamwera en células de mamífero.

La utilización de cortes orientados en monocapas infectadas con el virus Bunyamwera (VBUN) y procesadas por microscopía electrónica de transmisión (MET) permitió la identificación de nuevas estructuras membranosas organizadas en multilamelas cuyo origen y función eran desconocidos. Su diseño estructural y su situación basal en la célula sugirieron una función de adhesión. En los estudios recogidos en la presente memoria se obtuvieron, también datos nuevos en cuanto a la liberación y propagación del VBUN.

Los estudios se centraron en la caracterización de la estructura y función de estructuras membranosas de diseño muy sofisticado que habíamos encontrado en zonas basales de células en cultivo infectadas por Bunyavirus, cuando son procesadas por la técnica de cortes seriados orientados y microscopía electrónica de transmisión. La doctoranda llevó a cabo un estudio estructural exhaustivo de estas estructuras nuevas, no descritas en la bibliografía, estudio que incluyó microscopía electrónica 2D y 3D y microscopía confocal. La video-microscopía de células vivas seguida de microscopía correlativa mostró la dinámica de formación de estas estructuras durante la progresión de la infección. Los datos obtenidos, junto con el diseño de las estructuras, idéntico a nivel micrométrico al de los dedos de animales con gran capacidad de adhesión, apuntaron a una función de super-adhesión en las células infectadas, en las que la liberación masiva de virus en zonas basales provoca un levantamiento y desprendimiento parcial. Esta posible función adhesiva se confirmó al tratar las células con agentes que promueven el despegue, ya que los cultivos infectados fueron claramente más resistentes que los no infectados. En células en las que la liberación del virus tiene lugar por zonas apicales no se ensamblaron las estructuras multilamelares y estas células, tanto control como infectadas, fueron muy sensibles a los tratamientos que las despegan de los sustratos. La doctoranda buscó también cambios en los niveles de expresión y en los patrones morfológicos observados por inmunofluorescencia, de diversas proteínas del citoesqueleto y proteínas celulares implicadas en adhesión, no encontrando diferencias significativas entre células control e infectadas.

La señalización que se desencadena cuando se inicia la liberación de nuevos virus en zonas basales induce por tanto una reorganización de membranas pre-existentes en la superficie celular, muy probablemente en los reservorios que las células usan para el ensamblaje rápido de filopodios y estructuras similares, dando lugar a prolongaciones cuyo diseño en la zona de contacto con el sustrato permite una gran capacidad adhesiva. Las células se defienden así de la muerte inmediata que sería provocada por el desprendimiento completo.

Finalmente, se encontró estructuras filamentosas extracelulares que contienen actina y a las que se adhieren masivamente los virus extracelulares liberados y sobre los que parecen viajar a células vecinas. Estos datos sugieren la existencia de un nuevo mecanismo de propagación de virus que deberá ser caracterizado en estudios futuros.

La aplicación de técnicas de vídeo-microscopía de célula viva y microscopía correlativa, han permitido realizar un estudio detallado de las regiones basales de las células infectadas. Igualmente, se realizaron ensayos funcionales y tratamientos con drogas que permitieron asignar una función adhesiva a las nuevas estructuras membranosas y una posible participación de los haces de filamentos extracelulares en la liberación y propagación de los nuevos virus infectivos.

Introducción

1. Virus.

Los virus son parásitos intracelulares obligados, que dependen de factores celulares para poder completar su ciclo vital (Freed, 2004a). Son patógenos devastadores para humanos, animales, plantas, bacterias, hongos y levaduras (Nagy, 2008) e incluso existen virus que pueden parasitar la maquinaria ensamblada por otros virus, como es el caso del virus Sputnik, que parasita la factoría viral de los Mimivirus (La Scola y cols., 2008; Pearson, 2008). Los Mimivirus son virus de gran tamaño que ensamblan su factoría viral en el citoplasma de una ameba, *Acanthamoeba polyphaga* (La Scola y cols., 2003).

A diferencia de las células, los virus no pueden replicarse por crecimiento o división, pero usan sus genomas para redirigir la actividad celular en su propio beneficio y generar así nuevas partículas virales. La replicación viral y en ocasiones el ensamblaje del virus son procesos que se llevan a cabo en estructuras complejas denominadas factorías virales, viroplasma o inclusiones virales. Las factorías virales son complejas interacciones entre componentes celulares y virales (Miller y Krinjsel-Locker, 2008; Netherton y cols., 2007, 2008; Mackenzie, 2005; Novoa y cols., 2005a; Salonen y cols., 2005; Wileman, 2006). Las factorías virales son estructuras complejas construidas por virus ARN (ácido ribonucleico) y ADN (ácido desoxirribonucleico). En el caso de los virus ADN como son los Pox-, Irido- y Asfarvirus, emplean el mecanismo de defensa celular de formación de agresomas o de autofagosomas para concentrar los componentes necesarios para la replicación viral (Wileman, 2006; Heath y cols., 2001) (véase punto 4 de la Introducción "Factorías virales"). Durante la formación de los sitios de ensamblaje y replicación viral, se producen cambios en la estructura y la distribución de orgánulos celulares, la organización del citoesqueleto, así como en las membranas celulares. La reorganización del citoesqueleto puede, por ejemplo, facilitar la salida de los nuevos virus y bloquear la ruta endocítica (durante la infección de virus ARN, de doble cadena y polaridad positiva) reduciendo así la liberación de mediadores inflamatorios como consecuencia de la respuesta inmune adquirida (Netherton y cols., 2007).

Los genomas virales se caracterizan por presentar una única especie de ácido nucleico constitutiva, que puede ser ADN o ARN, monocatenario o bicatenario con estructura de doble hélice. Los virus se pueden clasificar bien por la célula a la que parasitan (animal, planta, bacteria), por su forma (helicoidal, poliédricos o complejos), la presencia de envoltura o por el ácido nucleico que forma su genoma. Según la clasificación de Baltimore, los virus se pueden clasificar dependiendo de la composición de sus genomas (Baltimore, 1971):

1. Virus ADN de doble cadena (ADN dc).
2. Virus ADN de cadena sencilla (ADN cs).
3. Virus ARN de doble cadena (ARN dc).
4. Virus ARN de cadena sencilla y polaridad positiva (ARN cs (+)).
5. Virus ARN de cadena sencilla y polaridad negativa (ARN cs (-)).
6. Virus ARN de cadena sencilla y polaridad positiva con intermediario de ADN durante el ciclo viral (ARN-RT cs).
7. Virus ADN de doble cadena que replican gracias a una hebra sencilla de ARN (ARN-RT dc).

1.1. Virus cuyo genoma es ARN.

El ácido nucleico de estos virus es usualmente ARN monocatenario, pero también puede ser ARN bicatenario. Los virus ARN monocatenarios pueden clasificarse, a su vez, según el sentido o polaridad de su ARN, en negativos o positivos. Los virus ARN positivos son idénticos al ARNm viral y, por lo tanto, pueden ser inmediatamente traducidos por la célula huésped. El ARN viral negativo es complementario al ARNm y, por ello, debe convertirse en ARN positivo por la acción de una ARN polimerasa antes de la traducción (Patton, 2008).

Todos los virus ARN, excepto los Retrovirus, codifican una ARN polimerasa dependiente de ARN para catalizar la síntesis de nuevos genomas y de ARNm (Flint y cols., 2005). Se caracterizan por los altos rangos de mutación espontánea en sus genomas en comparación con los virus ADN (Domingo y Holland, 1997) lo que provoca la aparición de nuevos virus que pueden dar lugar a interacciones nuevas entre factores virales y celulares.

Este tipo de virus se caracteriza por replicar en superficies citosólicas de las membranas intracelulares de los orgánulos (retículo endoplasmático, aparato de Golgi, autofagosomas -usados por virus ARN-, mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas, vacuolas o membranas únicas inducidas por la infección viral) (Nagy, 2008). Recientemente, estudios con Alphavirus han demostrado la formación de complejos replicativos activos en replicación en la cara citosólica de la membrana plasmática (Ahola, 2010; Frolova y cols., 2010).

1.1.1. Virus de ARN de doble cadena.

Miembros de este grupo son los Rotavirus, conocidos globalmente por ser los causantes de gastroenteritis en niños pequeños, y el virus de la lengua azul (VBT) (Roy, 2008). Existen seis familias de virus cuyo genoma es ARN de doble cadena: *Reoviridae*, *Birnaviridae*, *Totiviridae*, *Partitiviridae*, *Hypoviridae* y *Cystoviridae*. En los últimos años, se han realizado importantes progresos para determinar a nivel atómico y subatómico las estructuras de proteínas de la cápsida de muchos de estos virus, a la vez que se ha profundizado en el entendimiento de los procesos replicativos y de ensamblaje (Patton, 2008).

1.1.2. Virus de ARN de cadena sencilla.

La asociación de la síntesis de ARN viral en membranas celulares es una característica típica de los virus de polaridad positiva y negativa (Miller y Krijnse-Locker, 2008; Novoa y cols., 2005a). Ejemplos de estos virus son los Flavivirus y los Picornavirus en cuyo genoma codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN (Lescar y Canard, 2009). También pertenecen a este grupo las familias virales *Coronaviridae*, *Arenaviridae* y *Caliciviridae*.

Existen siete familias reconocidas de virus ARN de polaridad negativa, *Rhabdo-*, *Paramyxo-*, *Filo-*, *Borna-*, *Orthomyxo-*, *Bunya-* y *Arenaviridae* (Neumann y cols., 2002). A la primera familia pertenece el virus de la rabia, que en neuronas infectadas induce la formación de los cuerpos de Negri (Jackson y cols., 2001) y el virus de la estomatitis vesicular. Las primeras cuatro familias se caracterizan por tener genomas no segmentados, mientras que las otras tres presentan genoma segmentado de 6-8, 3 y 2 segmentos de ARN de polaridad negativa, respectivamente. Muchos miembros de este grupo son patógenos con alta prevalencia en seres

humanos como son el virus respiratorio sincitial, el virus Ébola y el virus Marburg, así como virus de gran impacto en agricultura y en ganadería (Neumann y cols., 2002). El genoma de estos virus es copiado por una ARN polimerasa para formar una cadena sencilla de polaridad positiva de ARN. Esto significa que el virus debe codificar para una polimerasa ARN dependiente de ARN. La cadena sencilla de polaridad positiva sirve como de ARNm viral, el cual es traducido en proteínas virales tempranas por los ribosomas celulares. Entre ellas, la de replicasa de ARN permite la replicación del genoma viral produciendo una nueva cadena sencilla de ARN de polaridad negativa. El ciclo vital de los virus sigue los siguientes pasos (Samuel, 2005):

1. Transcripción temprana del ARN de polaridad negativa por la ARN polimerasa dependiente de ARN y producción de ARNm subgenómico y de ARN monocatenario positivo.
2. Traducción del ARNm viral. Producción y acumulación de las proteínas virales tempranas.
3. Las proteínas tempranas forman el complejo replicativo, incentivando la producción del ARN monocatenario positivo. Esta molécula de ARN sirve de molde durante la replicación para dar lugar a ARN monocatenario negativo genómico. Este paso lo realiza la replicasa viral dependiente de ARN.
4. Transcripción tardía del ARN monocatenario negativo por parte de la transcriptasa (en el caso del VBUN esta función la lleva a cabo la polimerasa L).
5. Traducción tardía del ARNm. Producción y acumulación de las proteínas tardías (estructurales).
6. Ensamblaje de la nucleocápsida. Gemación y formación de la partícula viral madura en asociación a la membrana celular que proporciona la envoltura viral (en el caso del VBUN, la envuelta proviene de las membranas de Golgi, en las que están insertadas las glicoproteínas virales).

2. Familia *Bunyaviridae*.

La familia *Bunyaviridae* se estableció formalmente en 1975 y actualmente está compuesta por cuatro géneros de virus que infectan animales (*Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* y *Hantavirus*) y uno que infecta plantas (*Tospovirus*) (Schmaljohn y Nichol, 2007; Nichol y cols., 2005; van Regenmortel y cols., 2000). La mayor parte de los virus de la familia son Arbovirus (del inglés “arthropod borne virus”), es decir, que se transmiten por artrópodos, siendo la excepción los virus del género *Hantavirus*, cuya transmisión ocurre principalmente a través de contacto con animales infectados (excrementos, saliva, orina), aunque la ruta infectiva por aerosoles es indudablemente la más conocida en la transmisión entre roedores y humanos (Vapalahti y cols., 2003; Lednicky, 2003), la transmisión del virus por mordedura de roedor también puede provocar infección en el humano (Hinson y cols., 2004). Los Arbovirus causan algunas de las más devastadoras enfermedades en humanos. Se han identificados unos 500 Arbovirus, muchos de los cuales pertenecen a las familias *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae* y *Reoviridae* (Blair y cols., 2000). Muchos de los virus de esta familia se han calificado como virus emergentes (Soldan y cols., 2005), presentan una amplia distribución por el mundo y algunos causan graves patologías en el hombre.

En la naturaleza, los Arbovirus presentan ciclos en los que se multiplican en un artrópodo hematófago, como un mosquito o garrapata, y son transmitidos en la

saliva a los huéspedes vertebrados cuando el artrópodo se alimenta de su sangre. La replicación en el hospedador vertebrado genera el suficiente título viral para transmitir la infección a otro artrópodo que se alimente de su sangre (Blair y cols., 2000). La mayoría de los miembros de la familia causan infección en el vector durante toda su vida. Varios tipos de mosquitos, así como garrapatas, pueden transmitir virus de la familia *Bunyaviridae*, pero cada especie viral infecta un número limitado de especies de insectos y de hospedadores vertebrados (Webster y cols., 1994; Porterfield y cols., 1975; Murphy y cols., 1974). Los principales reservorios vertebrados para Arbovirus de importancia en salud pública son las aves y los roedores (Gubler, 2002). Generalmente, las enfermedades causadas en humanos por parte de Arbovirus ocurren accidentalmente por picadura o mordedura del artrópodo y debido a que el humano no es el huésped preferente la transmisión del virus por esta vía suele producir títulos bajos de viremia, aunque en algunos casos pueden desarrollar procesos de fiebres hemorrágicas o encefalitis (Blair y cols., 2000; Gonzalez-Scarano y Nathanson, 1996; Schmaljohn, 1996; Webster y cols., 1994; Benenson, 1990).

Los virus de esta familia comparten características morfológicas y bioquímicas, incluyendo un genoma ARN trisegmentado de cadena sencilla y de polaridad negativa, un sitio en la cara citoplasmática de endomembranas para la replicación y la transcripción viral, y ensamblaje y maduración en el aparato de Golgi de las células infectadas (Novoa y cols., 2005b; Schmaljohn y Hooper, 2001; Elliott, 1997; Petterson y cols., 1996).

En la Figura I-1 se ha tomado el ciclo de vida del virus de La Crosse (VLAC) para representar el ciclo de los Bunyavirus, incluido el VBUN. En la naturaleza, hembras del género *Aedes*, aunque no exclusivamente (ver el punto de la Introducción 3. Virus Bunyamwera), transmiten el virus por picadura a roedores. En el mosquito, como ya se ha citado anteriormente, la infección no produce enfermedad y se mantiene de forma persistente, transmitiéndose vía transovárica a la descendencia de una hembra de mosquito infectada. Además, el mosquito también puede ser infectado al picar a un roedor previamente infectado y también, menos frecuentemente, a un humano que también estuviera infectado.

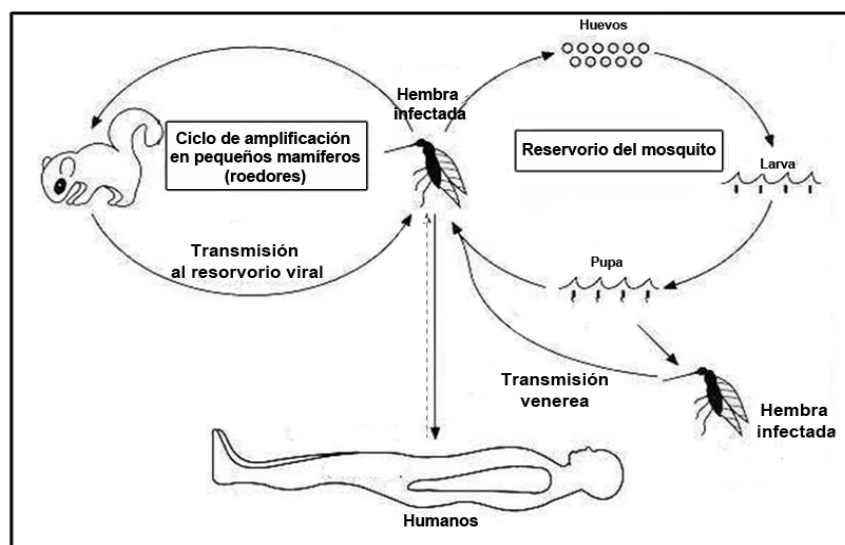


Figura I-1. Ciclo vital del virus de La Crosse modificado para el VBUN. Modificado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mmed&part=A3006>.

En cuanto a los virus de la familia más peligrosos por causar enfermedades graves en los seres humanos son: serogrupo California (*Bunyavirus*), virus de la Fiebre del Valle del Rift (VFVR) (*Phlebovirus*), Hantaan virus (VHTN) (*Hantavirus*), el virus de La Crosse y el virus de fiebres hemorrágicas de Congo-Crimea (VHCC) (*Nairovirus*) (Nichols, 2001) (Tabla I-1). Estos virus causan encefalitis o fiebres hemorrágicas por lo que tienen importancia en salud pública (Bouloy, 2009). Las fiebres hemorrágicas están relacionadas con incremento de la permeabilidad del endotelio por rotura de vasos sanguíneos. Aunque la mortalidad en humanos del VFVR no superaba el 2%, en los últimos estudios parece estar incrementándose hasta un 35% (LaBeaud y cols., 2008). En relación a vacunas, el primer intento de vacuna contra el VFVR desarrollada por Smithburn y cols., en 1949, no fue totalmente efectiva. Actualmente se están realizando estudios con dos posibles candidatas a vacunas basadas en las glicoproteínas Gn y Gc utilizando *Drosophila* como sistema de expresión (de Boer y cols., 2010). El receptor celular con el que interaccionan los virus de la familia no se ha identificado, pero se ha visto que algunos *Hantavirus* interaccionan con las integrinas $\beta 3$ y $\beta 1$ para su entrada en las células endoteliales (Gavrilovskaya y cols., 1999). Con la excepción del virus de la fiebre amarilla, no existen vacunas o tratamientos eficaces contra los Arbovirus que producen enfermedades (López-Montero y Risco, 2011).

Durante las pasadas décadas, han ocurrido importantes episodios en Egipto, África Oriental, Kenya, Tanzania y Madagascar en relación al virus de la Fiebre del Valle del Rift, virus que llegó hasta Yemen y Arabia Saudita en el año 2000 (Swaneped y Coetzer, 2004). De hecho, la zoonosis provocada por este virus es capaz de causar las mayores epidemias entre ganado y humanos, no sólo en las regiones endémicas del vector (Morrill y McClain, 1996). Por todo ello, en los últimos años existe un interés en aumento por el estudio de los Bunyavirus y de su virulencia, biología molecular y epidemiología (Bouloy, 2009; Elliot, 2009).

En relación a la entrada de los virus en la célula infectada, en los géneros *Phlebovirus* y *Nairovirus* ocurre en vacuolas fagocíticas después de la adsorción viral en la membrana plasmática y su reconocimiento por el receptor (Rwambo y cols., 1996). En *Hantavirus* se ha demostrado la importancia de la ruta endocítica y de los compartimentos ácidos para que el virus sea realmente infectivo. Este hecho se ha comprobado al inhibir la infección viral después de tratar las células con cloruro amónico que impide la acidificación de los lisosomas (Hacker y Hardy, 1997). Los *Hantavirus* entran en la célula por vesículas rodeadas de clatrina, transferidas a endosomas tempranos, para ser transportados después a los lisosomas (Jin y cols., 2002). Así, el bajo pH de las vesículas en las que se encontraría el virus provocaría un cambio conformacional en las glicoproteínas, que facilitaría la fusión de las membranas viral y celular, liberando el genoma viral y permitiendo el acceso de las ribonucleoproteínas a las membranas de Golgi (Gonzalez-Scarano y cols., 1985), donde se ensamblan los complejos replicativos (Fontana y cols., 2008).

Tabla I-1: Géneros de la familia *Bunyaviridae* que infectan a animales y humanos. El género *Tospovirus*, que infecta a plantas, no se recoge en la Tabla.

Género	Virus	Enfermedad	Vector	Hospedador	Síntomas
<i>Orthobunyavirus</i>	Virus Bunyamwera (VBUN)	Enfermedad febril	Mosquitos (<i>Aedes</i>)	Roedores y humanos	Leves febrículas.
	Virus de La Crosse (VLAC)	Encefalitis de La Crosse		Humanos	Fiebre, vómitos, letargo y fuertes dolores de cabeza.
	Virus del cañón de Jamestown (VJC)	Encefalitis del cañón de Jamestown		Humanos y roedores	Fiebre, vómitos, letargo, fuertes dolores de cabeza y rigidez de nuca.
	Virus Akabane (VAKA)	Infección viral Akabane		Vaca, oveja y cabra	Viremia plasmática, necrosis, muerte neuronal y exantema febril.
	Virus de Valle del Caché (VVC)	Fiebre del valle del Caché		Rumiantes domésticos, ciervos y caballos	Rigidez articular, hipoplasia del músculo esquelético. Artrogriposis e hidranencefalia.
	Virus Oropouche (VOPO)	Fiebre del Oropouche		Humanos	Fiebre elevada y mialgias.
<i>Phlebovirus</i>	Virus de la Fiebre del Valle del Rift (VFVR)	Infección del Valle del Rift	Mosquitos y moscas flebotomas	Humanos	Desde leves febrículas a fiebres hemorrágicas, rigidez de nuca, sensibilidad a la luz, pérdida de apetito y vómito, conjuntivitis, miositis, y encefalitis. Complicaciones neurológicas.
	Virus de la Toscana (VTOS)	Infecciones de la Toscana		Humanos	Meningitis, fiebre elevada, dolores musculares.
	Virus Uukuniemi (VUU)	Infecciones Uukuniemi		Humanos y pájaros	No conocida.
<i>Nairovirus</i>	Virus hemorrágico de Congo-Crimea (VHCC)	Fiebre hemorrágica de Congo-Crimea	Garrapatas e insectos del género <i>Culicoides</i>	Humanos	Fiebres hemorrágicas severas, mialgia y fuertes dolores de cabeza.
	Virus de la enfermedad de la oveja de Nairobi (VNSD)	Infección de la oveja de Nairobi		Cabras y ovejas	Fiebre hemorrágica y gastroenteritis sanguinolentas. Ritmo cardíaco y respiratorio acelerado.
<i>Hantavirus</i>	Virus Hantaan (VTHN)	Síndrome de distrés Respiratorio del adulto	Ratas y ratones	Humanos	Fiebres hemorrágicas con fallo renal, edema pulmonar y aumento de capilaridad en los pulmones.
	Virus Dobrava	Enfermedad renal			Dolores musculares, fiebre, migraña, tos, náusea ó vómito, diarrea, dolor abdominal.
	Virus Sin Nombre (VSN)	Enfermedades cardiopulmonares			Fiebre, dolores musculares, tos y dolor de cabeza. Pulmones con líquido.
	Virus Seúl (VSEO)	Enfermedad renal			Nefritis, fiebre, sangre en orina y heces.

2.1. *Orthobunyavirus*.

El género *Orthobunyavirus* está constituido por virus de ARN de cadena sencilla trisegmentado y polaridad negativa. Son causantes de enfermedades tanto benignas como severas en humanos (Yandoko y cols., 2007). Dentro de este mismo género existen patógenos que afectan a animales y a humanos, como es el caso del virus La Crosse (VLAC), transmitido principalmente, por el mosquito *Aedes triseriatus* provocando encefalitis pediátrica severa (Nasci y cols., 2000; Blair y cols., 2000). Aproximadamente el 10% de los niños con síntomas clínicos desarrollan defectos cognitivos y de comportamiento a largo plazo (McJunkin y cols., 2001). Otro virus perteneciente a este mismo género causante de una zoonosis similar a la del Dengue, es el virus Oropouche (VORO) transmitido por la picadura de mosquitos *Culicoides paraensis* (Bennett y cols., 2008) y *Aedes albopictus*. Tradicionalmente la distribución del virus VORO se concentraba en regiones amazónicas, del Caribe y Panamá y fue descrito por primera vez en Brasil en 1960 (Anderson y cols., 1961). Las infecciones del virus del Valle de Caché (en Norteamérica) y del virus Aino (en África, Asia y Australia) producen deformaciones en el feto y abortos en el ganado vacuno y ovino. En regiones menos cálidas como Alemania, Italia, la antigua Yugoslavia, la República Checa y en la región de Moravia, el 20% de los pacientes hospitalizados con enfermedades febriles han sido infectados por el Bunyavirus Tahyna (VTAH) (Elliott, 1997). Se ha detectado recientemente la presencia del virus de fiebres hemorrágicas de Congo-Crimea en regiones del Sudeste de Rusia, Grecia y Turquía (Maltezou y Papa, 2010).

Los virus Maguari, Guaroa y Valle de Caché, pertenecen al mismo género que el virus Bunyamwera. Recientemente el virus Ngari se ha identificado como un recombinante del VBUN, que posee el segmento M del virus Batai. El virus Ngari está asociado a casos de fiebres hemorrágicas en Somalia y Kenia junto a un brote de enfermedades febriles en Sudán (Briese y cols., 2006).

La mayoría de los virus que pertenecen a este género están recogidos en dieciocho serogrupos detectados por pruebas serológicas con anticuerpos (contra la proteína N), hemaglutinación y neutralización de las glicoproteínas mediante anticuerpos (Nichol y cols., 2005). Los dieciochos serogrupos son *Anopheles A.*, *Anopheles B.*, Bakau, Bunyamwera, Bwamba, group C, Capim, California, Gamboa, Guama, Koongol, Minatitlan, Nyando, Olifanstlei, Patois, Simbu, Tete y Turlock (Nichol, 2001).

3. Virus Bunyamwera.

En 1943 durante un estudio de fiebre amarilla se aisló por primera vez el virus Bunyamwera (VBUN), a partir de mosquitos del género *Aedes* (Smithburn y cols., 1946). Miembro de la familia *Bunyaviridae*, el VBUN pertenece al género *Orthobunyavirus*. El VBUN es el prototipo de los Bunyavirus y del género *Orthobunyavirus* (Eifan y Elliot, 2009). El VBUN presenta un gran número de serotipos y variantes (virus Batai; virus de Valle Escondido; virus Calovo; virus Chittoor). Su distribución está directamente relacionada con la distribución del mosquito-vector (Newton y cols., 1980).

El VBUN no produce ningún efecto citopático en el mosquito, en el que causa infección persistente. En humanos, el VBUN no genera ninguna enfermedad grave, produciendo únicamente leves febrículas, aunque virus de la misma familia sí son patógenos importantes (Sidwell y Smeeth, 2003). Preferentemente, aunque no

exclusivamente, el vector de VBUN es el mosquito-tigre (*Aedes albopictus*). Recientemente se han aislado del mosquito *Aedes trivittatus* (Coquillett), virus pertenecientes al serogrupo Bunyamwera, como es el caso del virus Potosí (VPOT), detectado en el estado de Nueva York (Ngo y cols., 2006). También en el estado de Nueva York se ha detectado la presencia del mosquito-tigre. Además el género *Anopheles* se considera vector del virus VBUN (Calisher, 1988). En la especie *Anopheles claviger*, se ha aislado virus que podrían pertenecer al grupo Bunyamwera (Traavik y cols., 1985). La información en relación a la infección del VBUN en células de mosquito en cultivo es escasa (López-Montero y Risco, 2011; Newton y cols., 1981; Tesh y Gubler, 1975). Una de las diferencias más importantes entre la replicación del VBUN en células de mamífero y de mosquito son los altos niveles de proteínas virales, así como su acumulación en células de mamífero y la alta eficiencia de producción de virus infecciosos en células de mosquito. Cuando se infectan células de mosquito derivadas de *A.albopictus*, las células sufren tres diferentes estados que involucran cambios significativos en la forma celular y que resultan en el control de la infección por parte de las células cuando se alcanza la fase de persistencia (López-Montero y Risco, 2011).

Una vez que los vectores se establecen en una zona, la aparición de los Arbovirus que transmiten los virus es cuestión de tiempo (Mckenzie y cols, 2004). En la Figura I-2 se detalla por regiones geográficas la distribución del mosquito-tigre en Europa (datos de 2009).

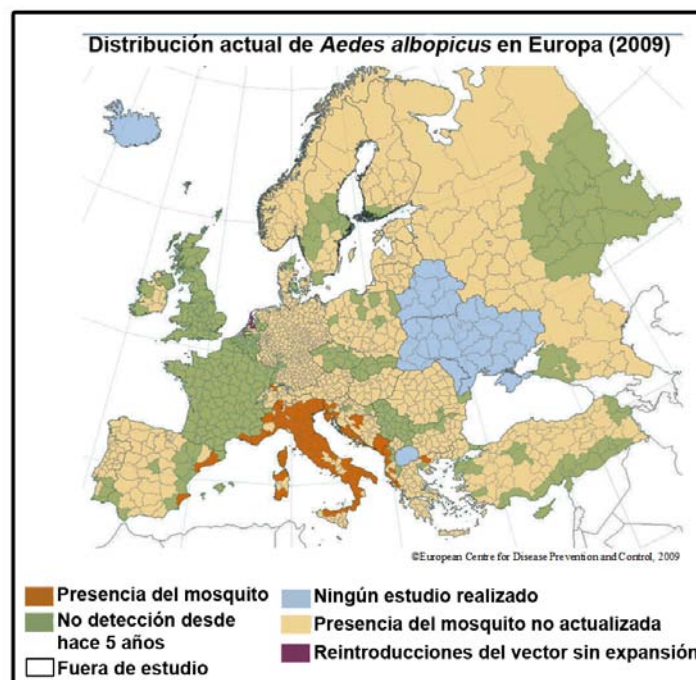


Figura I-2. Distribución del mosquito tigre en Europa (2009). Datos proporcionados por el ©European Centre for Disease Prevention and Control, 2009.

3.1. Morfología del VBUN.

Los viriones del VBUN son esféricos de 80-120 nm de diámetro (ver Figura I-3). Presentan una envuelta procedente del aparato de Golgi donde se produce la maduración del virus. En esta envuelta se insertan las glicoproteínas Gc y Gn (Novoa y cols., 2005b).

Estudios de microscopía electrónica demostraron que el virión maduro del VBUN podría tener simetría icosaédrica (Novoa y cols., 2005b). Recientes estudios por criomicroscopía electrónica del virus de la Fiebre del Valle del Rift, (Huiskonen y cols., 2009; Sherman y cols., 2009) y estudios por tinción negativa con el virus Uukuniemi, revelaron que los Bunyavirus tienen geometría icosaédrica (Overby y cols., 2008).

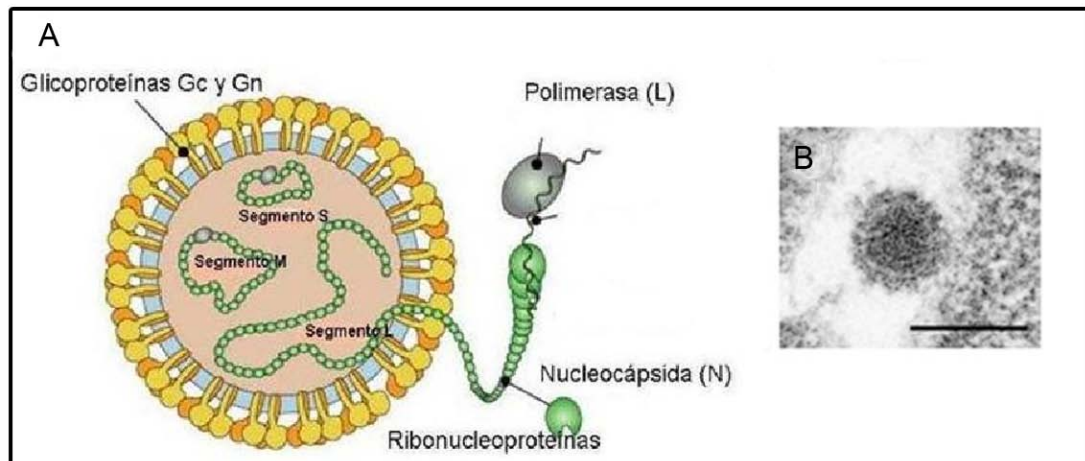


Figura I-3. Estructura de Bunyavirus. (A) La partícula viral es esférica y tiene un diámetro de unos 80-120 nm aproximadamente. En la envuelta viral se insertan las glicoproteínas Gc y Gn formando los “spikes”. En el interior se encuentran los tres segmentos de ARN monocatenario de polaridad negativa, L, M y S que codifican para las distintas proteínas virales. Asociadas al ARN están, la polimerasa viral (L) y la nucleocápsida (N), formando las ribonucleoproteínas (RNP). Modificado de http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/82.html. (B) Micrografía electrónica de una sección de VBUN maduro liberado de células BHK-21 infectadas a 10 hpi (Salanueva y cols., 2003). Barra 100 nm.

3.2. Genoma y proteínas.

Los tres segmentos del genoma ARN se denominan L (“large”), M (“medium”) y S (“small”) (Figura I-4). Las secuencias de cada uno de los extremos 5’ y 3’, respectivamente, están conservadas y son idénticas para cada uno de los segmentos en todas las especies del mismo género. Los segmentos son de 6,8 kb, 4,4 kb y 0,9 kb, organizándose de forma circular debido a la complementariedad de los extremos 5’ y 3’, lo que hace que puedan superponerse las secuencias y generar estructuras circulares cerradas de forma no covalente, de tipo “mango de sartén” (“pan-handle”) (Schmaljohn y Hooper, 2001). El ARNm complementario al segmento L codifica para la proteína L, que es la ARN polimerasa. El mensajero complementario al segmento M codifica para una poliproteína 3’Gn-NSm-Gc 5’, que tras un proceso de proteólisis da lugar a las dos glicoproteínas Gc y Gn y a la proteína no estructural NSm. Las glicoproteínas de VBUN forman proyecciones o “spikes” sobre la superficie de la envuelta viral (Shi y cols., 2007).

En el género *Orthobunyavirus*, el segmento S tiene dos pautas abiertas de lectura (ORFs, del inglés “open reading frame”) solapantes en el ARNc que dan lugar a la proteína N y a la proteína no estructural NSs a partir de los codones de iniciación de cada una de las ORFs (Bishop y cols., 1983).

En el virión maduro aparecen las cuatro proteínas estructurales: nucleocápsida (N), polimerasa viral (L) y dos glicoproteínas (Gc y Gn) (Schmaljohn

y Hooper, 2001). Las proteínas no estructurales NSm y NSs, no se incorporan en el virión maduro.

La proteína no estructural NSs, es un factor de virulencia de aproximadamente 11 kDa (Elliot, 1990), que detiene la síntesis de proteínas e inhibe la producción de interferón (Shi y cols., 2002; Bridgen y cols., 2001). NSs inhibe la fosforilación del dominio carboxilo terminal del complejo de la ARN polimerasa II celular, produciendo una reducción de la síntesis del ARNm, y por lo tanto de las proteínas celulares en células de mamífero pero no en las de mosquito (Kohl y cols., 2003; Bridgen y cols., 2001). NSs se ha encontrado en el núcleo celular, donde forma unas estructuras fibrosas en el caso del phlebovirus Sin Nombre (Weber y cols., 2001), aunque predominantemente suele aparecer en el citoplasma (Bridgen y cols., 2001; Weber y cols., 2001). Incluso dentro del mismo género *Orthobunyavirus*, la proteína NSs presenta una gran variación en la secuencia si es comparada con la proteína N (Dunn y cols., 1994). En el género *Hantavirus* se ha demostrado que NSs puede estar relacionada con procesos de apoptosis (Kohl y cols., 2003).

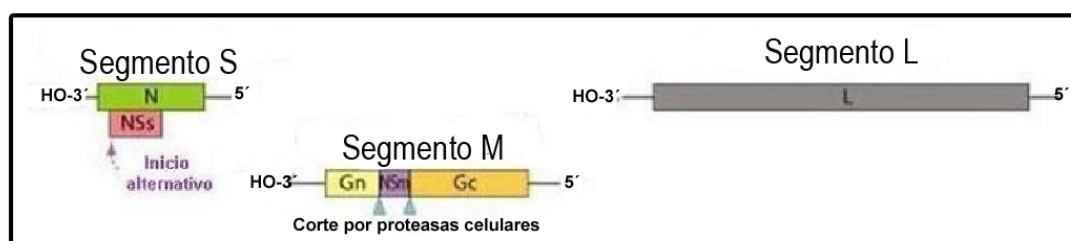


Figura I-4. Genoma del virus VBUN: El genoma del VBUN está compuesto por tres segmentos de ARN de cadena sencilla y polaridad negativa. El segmento S (0,9 kb) codifica para la proteína de la nucleocápsida, N y para la proteína no estructural NSs, el segmento M (4,4 kb) para las glicoproteínas virales, Gn y Gc, y para la proteína NSm. El segmento L (6,8 kb) codifica para la polimerasa viral, L. Modificado de http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/82.html.

NSm es una proteína de andamiaje no presente en los virus maduros (Fontana y cols., 2008), se acumula en el aparato de Golgi y está relacionada con la morfogénesis viral (Fontana y cols., 2008; Shi y cols., 2006). Su tamaño molecular es de 18 kDa (Elliot y cols., 1990). Mediante estudios de delección parcial, se ha confirmado que el dominio N-terminal de NSm es necesario para la morfogénesis viral (Shi y cols., 2006). NSm posee tres dominios transmembrana (Nakitare y Elliott, 1993). Estudios realizados en nuestro laboratorio mostraron que NSm se encuentra en los tubos virales, nuevas estructuras de origen viral, consistentes en elementos tubulares con un dominio tubular en un extremo y a menudo conectados con mitocondrias y sáculos de RER. Los tubos virales se ensamblan en el aparato de Golgi y contienen los complejos replicativos del virus en el dominio globular (Fontana y cols., 2008; Novoa y cols., 2005a). Se observó que los tubos virales contienen también intermediarios de ensamblaje viral actuando además, en la comunicación entre los orgánulos de la factoría del VBUN. Previamente, Salanueva y cols., 2003, observaron el ensamblaje en el Golgi de estos tubos que aparecían a tiempos tempranos de la infección y en cantidades relativamente fijas de 2 ó 3 por cisterna y marcados con anticuerpo anti-VBUN. Más recientemente, Fontana y cols., 2008, demostraron por análisis de secciones seriadas de toda la célula infectada, que los tubos virales son más abundantes (más de 50 en muchas células). Inmunomarcajes in situ y MET demostraron que NSm se localiza tanto en los dominios globulares (asociados al Golgi) como tubulares (abiertos al citosol) de los

tubos virales (Fontana y cols., 2008). Se detectó NSm en las membranas de Golgi cuando los nuevos virus se ensamblan (Fontana y cols., 2008). Estudios de inmunoprecipitación demostraron que NSm interacciona con la proteína N y con las glicoproteínas virales en células infectadas (Shi y cols., 2006). Datos recientes de nuestro laboratorio sugieren que NSm podría actuar como una proteína de andamiaje, facilitando la unión de las ribonucleoproteínas a los dominios citosólicos de las glicoproteínas virales Gc y Gn en las membranas del Golgi (Fontana y cols., 2008).

Mediante análisis de secuencia, se ha demostrado la presencia de cuatro dominios conservados en las polimerasas de la familia *Bunyaviridae* (Jonsson y Schmaljohn, 2001). La proteína L, de 250 kDa (Elliot, 1990) cataliza la iniciación, elongación y terminación de la síntesis de ARN y participa en el mecanismo de “cap-snatching”, es decir, secuestra los cebadores celulares con estructura “cap” en su extremo 5', que son necesarios para la transcripción (Jin y Elliott, 1993). La proteína L es la encargada de realizar funciones como replicasa y transcriptasa viral (Jin y Elliott, 1992). La polimerasa L realiza también las funciones de transcriptasa, endonucleasa, replicasa y probablemente de helicasa necesarias para la síntesis del ARNm viral y para la síntesis del ARN viral sin iniciador a partir del ARN complementario.

Las glicoproteínas Gc y Gn son glicoproteínas transmembrana tipo I (Shi y cols., 2004) cuyo precursor polipeptídico experimenta un procesamiento proteolítico cotraduccional (Elliott y cols., 1991; Elliott, 1990). El tamaño molecular de Gn es de 32 kDa y de Gc, 110 kDa (Pollitt y cols., 2005). Ambas proteínas Gc y Gn están precedidas por un péptido señal, por lo que seguramente la proteólisis de la poliproteína precursora la realice una proteína celular (Fazakerley y Ross, 1989). Tanto Gc como Gn se acumulan en el aparato de Golgi de células infectadas, localizando así el lugar de ensamblaje (Salanueva y cols., 2003; Lappin y cols., 1994; Nakitare y Elliot, 1993). Además ambas glicoproteínas son modificadas por la adición de oligosacáridos que se unen a asparaginas en sus formas maduras (Nichol y cols., 2005), (Pesonen y cols., 1982). La glicosilación de estas proteínas también está relacionada con la maduración del virus en el Golgi (Novoa y cols., 2005b). Tanto Gc como Gn poseen tres sitios potenciales de glicosilación (Shi y cols., 2005). Está aceptado que tanto Gc como Gn son necesarias para la entrada del virus en la célula, pero poco se sabe del comportamiento individual de cada glicoproteína en los eventos tempranos de la infección viral (Shi y cols., 2010). Los dominios citoplásmicos de ambas glicoproteínas tienen un papel importante en la fusión de la membrana del virus con la del lisosoma durante su entrada en la célula, así como en el ensamblaje y morfogénesis viral (Shi y cols., 2007). Las dos glicoproteínas forman un heterodímero y Gn juega un papel similar al de una proteína chaperona para promover el plegamiento correcto de Gc y su retención en Golgi (Shi y cols., 2005, 2004). Cuando se expresa sólo Gn, ésta localiza en Golgi, pero Gc es dependiente de la asociación con Gn (Shi y cols., 2004; Maddon y cols., 1986). La señal de retención en Golgi de Gn localiza en su dominio transmembrana (Shi y cols., 2004). La glicoproteína Gn está constituida por 302 residuos con una cola citoplasmática de unos 78 residuos, mientras que Gc tiene 957 residuos con una cola citoplasmática más corta de 25 residuos (Elliott, 1990). La región N-terminal de Gc es dispensable para la replicación viral en cultivos celulares (Shi y cols., 2009). La eliminación de la cola citosólica de Gn del precursor de las glicoproteínas, altera la retención y maduración en Golgi de Gc (Shi y cols., 2004).

La proteína N (nucleocápsida) es una proteína multifuncional que encapsida los tres segmentos de ARN que forman el genoma del VBUN (Eifan y Elliot, 2009),

siendo ésta necesaria para la síntesis del ARN. El tamaño de la proteína N en VBUN es de 25 kDa (Eifan y Elliot, 2009), llegando hasta 50 kDa en otros géneros de la familia como *Hantavirus* y *Nairovirus* (Elliot, 2009; Nichol y cols., 2005; Schmaljohn y cols., 2001; Elliot, 1997). La proteína N en el VBUN forma multímeros en las células infectadas (Eifan y Elliot, 2009), desde dímeros hasta estructuras multiméricas de alto peso molecular, con una preponderancia de tetrámeros (Leonard y cols., 2005). Fue demostrado por Dunn y cols., 1995, que las secuencias terminales del genoma y del antígeno son las que están implicadas en el proceso de encapsidación. La señal de encapsidación se ha localizado en los segmentos 5' del genoma y del antígeno (Osborne y Elliot, 2000). Esta proteína viral es la más abundante en las células infectadas y juega varios papeles importantes durante la replicación viral, como son proteger al ARN de la degradación e interaccionar con L, Gn y Gc, aunque los mecanismos de la interacción no se han definido (Schmaljohn y Nichol, 2007).

3.3. Ciclo vital del VBUN.

Las características generales del proceso de replicación y transcripción en el VBUN son muy similares a los de otros virus de genoma ARN sencillo y de polaridad negativa (Schmaljohn y Nichol, 2007). La transcripción del ARN viral a ARN mensajero es llevada a cabo por la polimerasa L y las ribonucleoproteínas. La polimerasa L se concentra en los dominios globulares de los tubos virales, estructuras que albergan el complejo replicativo del virus (Fontana y cols., 2008). El intermediario para la transcripción y la replicación es un ARN encapsidado por la proteína N en forma de ribonucleoproteínas (Eifan y Elliot, 2009). Así los ARN mensajeros que no son encapsidados por la proteína N permiten el acceso de los ribosomas y la traducción de las proteínas (Lowen y Elliot, 2005). Las proteínas virales son sintetizadas rápidamente, traduciéndose los mensajeros de los segmentos S y L en ribosomas libres en el citoplasma, y el de M en ribosomas unidos al RER. Una vez sintetizadas Gc y Gn, éstas se dirigen al aparato de Golgi en ausencia de otras proteínas virales para generar los sitios de ensamblaje (Lappin y cols., 1994), aunque para un transporte eficiente es necesaria la interacción entre Gc y Gn. Fontana y cols., 2008, sugirieron que los tubos virales, en comunicación con el citosol, podrían transferir los genomas virales recién replicados y ensamblarlos como ribonucleoproteínas en un medio protegido de las ARNasas celulares y facilitar posteriormente la transferencia de las RNPs a los sitios de ensamblaje. No siempre se incorpora la misma cantidad de ribonucleoproteínas en la partícula viral, lo que podría ser una posible explicación a las diferencias de tamaño observadas en los viriones por microscopía electrónica (Novoa y cols., 2005b). En el interior de los tubos, la actina y la miosina facilitarían el transporte de las RNPs hacia el citoplasma (Fontana y cols., 2008), donde interaccionarían con las colas citoplasmáticas de las glicoproteínas Gc y Gn. Los miembros de la familia *Bunyaviridae* adquieren la envuelta por “budding” en membranas del aparato de Golgi (Andersson y Petterson, 1998; Petterson y cols., 1996; Elliot, 1990). Los viriones son transportados hacia la membrana plasmática en vesículas de la ruta secretora (Schmaljohn y Hooper, 2001) y son secretados al medio extracelular (Figura RI-5).

Las membranas virales que contienen las glicoproteínas de la mayoría de los virus con envuelta se fusionan con las membranas celulares para liberar el genoma viral y poder así comenzar la replicación en el citoplasma celular (Harrison y cols., 2008, 2005; Pelchen-Matthews y Marsh, 2007). Los Bunyavirus se unen a la célula

hospedadora por medio de receptores específicos que no se han identificado aún. Se sabe que la proteolización de Gc y no de Gn favorece la unión entre el virus y las células de insecto pero no en células de mamífero (Ludwig y cols., 1989). Esto se debe a que, en células de mamífero, es la glicoproteína Gc la principal proteína de unión, mientras que la pequeña glicoproteína Gn juega ese mismo papel en células de mosquito (Plassmeyer y cols., 2005). Se ha sugerido que la entrada podría ser por endocitosis mediada por receptor, y es probable que el desensamblaje se produzca tras la acidificación del endosoma, mediante fusión de la membrana viral y endosomal, con la consiguiente liberación de las nucleocápsidas al citoplasma, como ocurre en el virus Uukui (Lozach y cols., 2010).

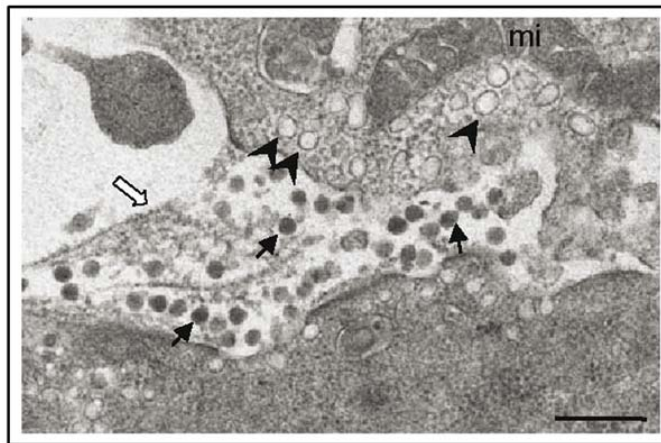


Figura I-5. Liberación de VBUN de células BHK-21 infectadas a 10 hpi. (mi) Mitocondria. Micrografía electrónica procedente de regiones basales de células BHK-21 infectadas, donde se observan los virus ya liberados al medio extracelular (flechas negras), caveolas (punta de flechas negras) y filamentos extracelulares (flecha blanca) (Fontana, López-Montero y Risco, 2007). Barra 300 nm.

La morfogénesis de VBUN tiene dos etapas de maduración; la primera ocurre dentro de las cisternas del aparato de Golgi y en una segunda etapa, en la que los virus sufren un cambio estructural de las glicoproteínas que da lugar a virus completamente infectivos (Novoa y cols., 2005b). Para la primera parte de la maduración se requiere un *trans*-Golgi funcional, como se demostró cuando la infección se realizó en presencia de drogas que alteran reversiblemente el subcompartimento *trans*-Golgi (Salanueva y cols., 2003) y utilizando líneas celulares deficientes en diversas etapas de glicosilación (Novoa y cols., 2005b). Además, el último paso de la glicosilación (adición de ácido siálico) ocurre en el *trans*-Golgi (Helenius y Aebi, 2001). En la factoría viral, el VBUN se replica e inicia el proceso de ensamblaje, construyendo dos intermediarios (virus intracelulares tipo I y tipo II) para dar lugar al virus maduro (Novoa y cols., 2005b). Las tres formas virales tienen una composición idéntica a nivel de proteínas. Los virus tipo I se transforman en virus más compactos y densos denominados virus intracelulares tipo II como consecuencia de la glicosilación en el *trans*-Golgi (Novoa y cols., 2005b). Modificaciones post-traduccionales identificadas en las proteínas estructurales de los Bunyavirus incluyen palmitoilación y procesamiento de las cadenas de azúcares de ambas glicoproteínas (Schmaljohn y Hooper, 2001). No se han descrito procesos proteolíticos, fosforilaciones o sulfatación en ninguna proteína estructural del VBUN. Las modificaciones moleculares con el transporte de precursores virales hacia regiones del *trans*-Golgi, en particular de la adquisición de la resistencia

Endo-H en las glicoproteínas virales, desencadenan una transformación estructural formando las partículas pre-infectivas, listas para salir de la célula, momento en el que pasan a ser partículas totalmente infectivas (Novoa y cols., 2005b). La N-glicosidación en las glicoproteínas virales es importante no sólo para un correcto plegamiento de las proteínas sino también, para una correcta función biológica (Spiro, 2002). Novoa y cols., 2005b, observaron cambios en la envuelta de VBUN sugiriendo que la maduración debía ser conducida por interacciones laterales entre las glicoproteínas Gc y Gn.

En los cortes orientados de monocapas de células BHK-21 infectadas siguiendo el protocolo descrito por Fontana, López-Montero y Risco, 2007, se observó la liberación de los virus maduros en zonas basales, coincidiendo con la aparición de estructuras membranosas complejas no descritas en la Bibliografía. En la Figura I-6 se representa la similitud en el diseño estructural entre las estructuras membranosas visualizadas en células BHK-21 infectadas por el VBUN y las almohadillas membranosas que forman parte del pie de los geckos a nivel microscópico. Las dimensiones a nivel micrométrico y nanométrico de las subdivisiones de las lamelas son equiparables a las lamelas que forman la estructura membranosa visualizada en los cortes estudiados por MET.

Las complejas estructuras membranosas detectadas en células infectadas son por tanto, similares a las terminaciones de las espátulas de los geckos, tanto en diseño morfológico como en dimensiones a nivel nanométrico.

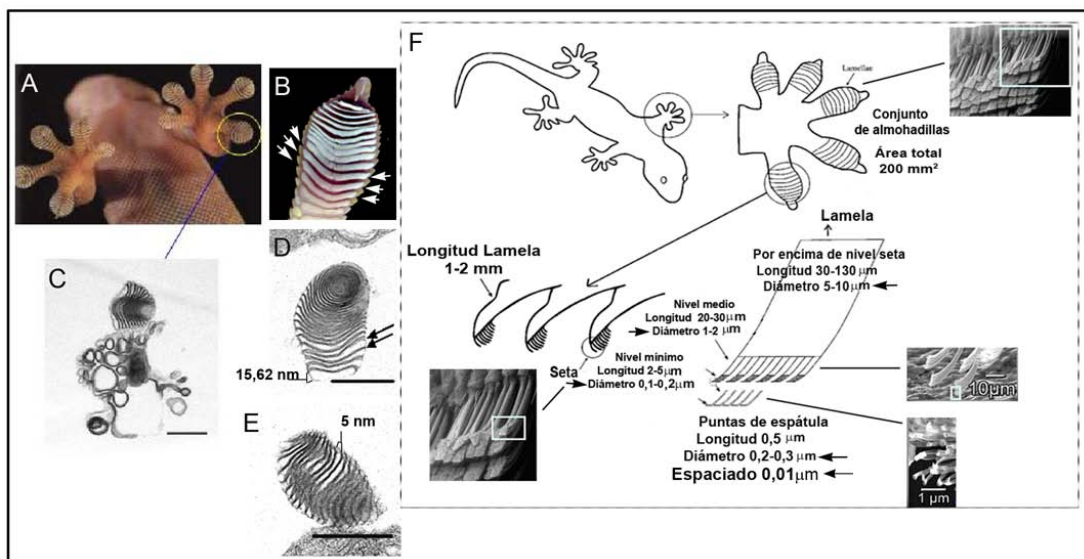


Figura I-6. Examen macro-microscópico del pie del *Tockay gecko* (*Gekko gecko*) y comparación con las estructuras multilamelares encontradas en monocapas de células BHK-21 infectadas con el virus VBUN y visualizadas por microscopía electrónica de transmisión. (A) y (B) Vista ventral de los pies y las almohadillas del *Tockay gecko*. (C), (D) y (E) Estructuras multilamelares detectadas en regiones basales de células BHK-21 infectadas con VBUN. (F) Esquema modificado de Kim y Bhushan, 2007, que resume el estudio macro-microscópico de las distintos componentes que forman la estructura del pie del geco. Cada dedo del pie del *Tockay gecko* está constituido por almohadillas con un área total de 200 mm². Las almohadillas se subdividen en tres niveles: nivel seta (30-130 µm de longitud y 5-10 µm de diámetro), nivel medio o de ramificación (20-30 µm de longitud y 1-2 µm de diámetro) y nivel de espátula (0,5 µm de longitud, 0,2-0,3 µm de diámetro y 0,01 µm de espaciado, aproximadamente.). En este último nivel, las estructuras membranosas son similares en diseño y dimensiones a las de los pies del *Tockay gecko*. Barras en (C), (D) y (E) de 50 nm.

En células de ratón, se ha demostrado que NSs inhibe la fosforilación del dominio carboxilo terminal de la ARN polimerasa celular tipo II, dificultando la síntesis de proteínas de origen celular (Kohl y cols., 2006). En el virus VLAC, muy similar al VBUN, NSs inhibe la traducción celular y activa las caspasas celulares que provocan la apoptosis celular (Shi, 2002). En el VFVR, NSs interacciona con la proteína celular SAP30. SAP30 pertenece al complejo represor Sin3A/NCOR/HDAC que interviene en la regulación de la transcripción (Le May y cols., 2008). El VLAC induce apoptosis en células BHK-21 y en una línea celular neuronal (Borucki y cols., 1999). Se conoce poco acerca del mecanismo y de las moléculas involucradas en la inducción de apoptosis durante la infección del virus VBUN pero lo que sí se ha descubierto es que los niveles de proteína antiapoptótica Bcl-2 parecen descender en células infectadas por VHTN (Kang y cols., 1999).

Estudios más recientes, también utilizando *Hantavirus*, han revelado que el movimiento de la proteína N depende de la red de microtúbulos de la célula, incluso que la rotura de los haces de microtúbulos provoca una disminución en el ARN viral (Ramanathan y cols., 2007). En el caso del VLAC, se ha observado que la replicación viral es inhibida por la proteína citosólica MxA, al formarse complejos con la proteína N (Kochs y cols., 2002). MxA es una GTPasa inducida por interferón, de la familia de la dinamina relacionada con numerosos procesos de transporte intracelular (Kochs y cols., 2002), y la homeostasis de los orgánulos (Haller y cols., 2007). En la infección del VLAC, MxA interacciona con la proteína N (Kochs y cols., 2002). Estudios recientes han mostrado la aparición de complejos formados por la nucleocápsida N y la proteína MxA en células humanas infectadas con Bunyavirus. La unión de MxA con N, que localiza en complejos citoplásmicos perinucleares asociados a membranas, inhibiría la replicación viral impidiendo la participación de N en la misma (Kochs y cols., 2002).

4. Factorías virales.

Las factorías virales son grandes estructuras construidas por componentes celulares y virales, donde los virus insertan los complejos macromoleculares necesarios para la replicación del genoma y la morfogénesis de nuevas partículas virales. Son, probablemente, el ejemplo más extremo de manipulación de la organización celular por parte de los virus. Se trata de estructuras tempranas en la infección que dramáticamente alteran zonas extensas de las células infectadas e inducen cambios en la composición y en la organización de componentes celulares utilizados por el virus (Novoa y cols., 2005a). Las factorías virales proporcionan una plataforma física para concentrar los factores necesarios para la síntesis de los nuevos genomas virales y las proteínas necesarias para el ensamblaje, favoreciendo la eficacia de los procesos. Las factorías virales varían en tamaño y número durante el transcurso de la infección (Eichwald y cols., 2004).

Existe un considerable interés en comprender cómo los virus provocan profundos cambios en la organización celular para construir las factorías. Los virus necesitan proteínas celulares para su propia replicación, siendo aquellas transportadas específicamente hasta las factorías virales (Netherton y cols., 2007). La asociación a membranas ofrecería un soporte al que anclar el complejo replicativo de manera que fijaría la replicación del ARN a un espacio concreto, incrementándose la concentración de los componentes necesarios y favoreciendo la protección frente a la reacción de las defensas del huésped ocultando el ARN de doble cadena intermediario de la replicación. Otra ventaja propuesta sería que las membranas a las

que se ancla el complejo replicativo proveerían ciertos lípidos necesarios para la replicación (Miller y Krijnse-Locker, 2008).

Una de las factorías virales mejor caracterizadas son las generadas por algunos virus ADN, como son los Pox-, Irido- y Asfarvirus, que emplean el mecanismo de defensa celular, conocido como la formación de agresomas, para concentrar los componentes necesarios para la replicación y morfogénesis viral. Los agresomas son una respuesta celular para acumular agregados de proteínas que han perdido su conformación nativa en regiones perinucleares (Johntson y cols, 1988). Son inclusiones proteicas que dependen de los microtúbulos situadas próximas al centro organizador central de microtúbulos (Netherton y cols, 2007). Los agresomas están envueltos en cajas de vimentina y contienen dineína, chaperonas y componentes del proteosoma (Wang y cols, 2009). Utilizando este mecanismos, algunos virus ADN ensamblan su factoría en el citoplasma de la célula infectada (Wileman, 2006; Heath y cols., 2001). La vimentina, junto a otras proteínas del citoesqueleto como tubulina y actina, han sido estudiadas en la infección del virus vaccinia en células HeLa, siendo detectadas en zonas de la factoría viral (regiones perinucleares) formando cajas de vimentina. También se ha detectado vimentina en los virus inmaduros del VV (Risco y cols., 2002). En las infecciones de virus ADN y ARN como el virus Rana-3, (Murti y cols., 1988; Chen y cols., 1986), el virus Junin (Cordo y Candurra, 2003), virus Theiler (Nédellec y cols., 1998) y el VIH (Lake y cols., 2003), la vimentina juega un importante papel en el ciclo vital y en el ensamblaje viral.

Entre las factorías virales descritas para virus ARN, encontramos las de los Bunyavirus (Novoa y cols., 2005a), Rhabdovirus (Netherton y cols., 2007), Orthoreovirus (Sharpe y cols., 1982), Rotavirus (Altenburg y cols., 1980) y Togavirus (Fontana y cols., 2010). Por otro lado, aunque existen modificaciones de las membranas celulares durante la infección por Arenavirus, no está claro que éstas sean verdaderas factorías virales (Netherton y cols., 2007).

La factoría viral que genera el virus VBUN se encuentra en una zona perinuclear donde se produce un reclutamiento de mitocondrias y de retículo endoplasmático alrededor del aparato de Golgi (Novoa y cols., 2005a), lugar donde ocurre la replicación y el ensamblaje de este virus (Fontana y cols., 2008). En la Figura I-7 se muestra la factoría viral ensamblada por el VBUN.

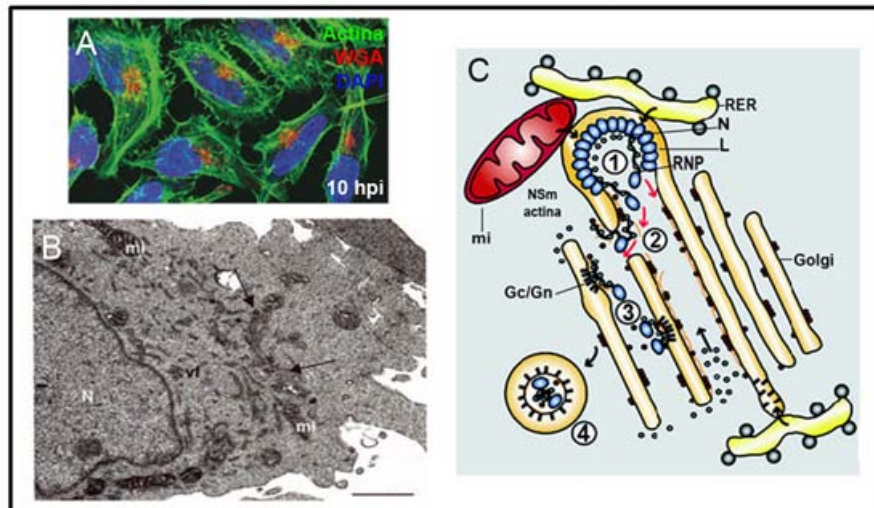


Figura I-7. Factoría viral de VBUN. En (A) actina (verde), marcador de la región *trans*-Golgi, WGA (rojo) y núcleos con DAPI (azul). (A) Células BHK-21 infectadas a 10 hpi. Visualización de factoría viral de VBUN por microscopía confocal (Fontana y cols., 2008). (B) Micrografía electrónica de transmisión de una sección ultrafina procedente de una célula BHK-21 infectada a 8 hpi, mostrando alrededor del núcleo (N) la factoría viral del VBUN. En la factoría viral se pueden observar reclutamiento de mitocondrias (mi) y cisternas de Golgi y sáculos de RER (flechas) (Novoa y cols., 2005b). (C) Modelo funcional de los tubos virales integrados en la factoría (Fontana y cols., 2008). Los tubos virales ensamblan en asociación con las membranas de Golgi utilizando actina endógena y NSm polimerizada para el andamiaje de la propia estructura. Los tubos contactan con los sáculos de RER y con mitocondrias (mi) que proporcionan factores celulares necesarios para la replicación y el ensamblaje. La polimerasa L se concentra en el dominio globular. Una vez replicado el ARN viral (paso 1), el ARN interacciona con las moléculas de la nucleocápsida N. La proteína N entra en los tubos por las zonas abiertas al citosol. Con la ayuda de proteínas como actina y miosina, las RNPs viajan hacia el citoplasma (paso 2), donde contactan con los dominios citosólicos de las glicoproteínas (Gc/Gn) concentradas en las membranas de Golgi. El proceso de envolvimiento o “budding” (paso 3) da lugar las nuevas partículas virales que incorporan ciertas cantidades de la proteína NSm y actina. Una vez que las partículas virales inmaduras están ensambladas están listas para la maduración y la secreción (paso 4) (Fontana y cols., 2008). Barra (B) 1 μ m.

5. Liberación de virus en cultivos celulares.

Las células epiteliales pertenecientes al sistema respiratorio y al tracto gastrointestinal son en muchas ocasiones la primera barrera de protección contra las infecciones virales. La membrana plasmática de estas células está dividida en dos regiones claramente diferenciadas en cuanto a función y organización, la apical y la basolateral (Rodríguez-Boulán y cols., 1992). La organización polarizada de las células epiteliales tiene importantes consecuencias en la patogénesis (Compans y Herrer, 1998). Después del proceso de replicación viral, algunos virus que infectan las células epiteliales preferentemente, son liberados por la superficie apical, favoreciendo así el establecimiento de una infección localizada. La mayoría de los virus que provocan infecciones respiratorias, como el virus influenza, parainfluenza, rinovirus o el virus respiratorio sincital se comportan de esta manera (Zimmer y cols., 2002). En cambio, los virus que son liberados por regiones basolaterales encuentran acceso al interior de los tejidos y al sistema sanguíneo, facilitando el desarrollo de una infección sistémica (Rai y cols., 1997). Los virus pertenecientes a esta categoría son el virus de la estomatitis vesicular, el virus del bosque Semliki, el virus VV y algunos Retrovirus, como el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1, VIH-1, (Zimmer y cols., 2002). La liberación de virus que ensamblan en la membrana plasmática y la liberación polarizada es consecuencia del transporte

direccional de proteínas virales de membrana a zonas específicas de la superficie de la célula (Blau y Compans, 1995).

En muchos virus con envuelta liberados por células epiteliales se ha visto que las glicoproteínas virales se localizan en el dominio de membrana plasmática por donde son liberados (Owens y Compans, 1989). En el caso del virus causante de la estomatitis vesicular, miembro de la familia *Rhabdoviridae*, la liberación basolateral coincide con la localización, también basolateral de su única proteína de superficie, la glicoproteína G (Fuller y cols., 1984).

Los virus con envuelta deben atravesar la membrana plasmática de la célula huésped dos veces durante su ciclo vital: inicialmente durante la entrada del virus y otra vez cuando se liberan las nuevas partículas. La entrada normalmente se produce por fusión de las membranas, bien directamente en la membrana plasmática seguida de un proceso de invaginación al interior de la célula, o bien en endosomas de pH bajo después de la endocitosis de los virus (Freed, 2004b). También en la liberación de Retrovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus y Filovirus es común que exista una aparente asociación entre las proteínas virales estructurales y microdominios de la membrana plasmática denominados ondas de membrana o “lipid rafts”. El papel que pueden desempeñar estos dominios sería facilitar el ensamblaje viral y la liberación (Freed, 2004b). Recientemente se ha descubierto que en Coronavirus (virus con envuelta de genoma ARN de polaridad positiva) de ratón, la entrada de los virus requieren ondas de membrana que no son necesarias para la salida (Choi y cols., 2005). Otro Coronavirus, el virus de la gastroenteritis porcina transmisible, es secretado por zonas apicales de células epiteliales de riñón de cerdo (Rossen y cols., 1998).

Los sitios de ensamblaje de virus como el de la inmunodeficiencia humana tipo 1, el virus SV40 y el virus influenza se encuentran en estos “lipid rafts” (Luo y cols., 2008).

En el virus de la fiebre hemorrágica de Congo-Crimea miembro de la familia *Bunyaviridae* (género *Nairovirus*), su liberación y entrada ocurre en zonas basolaterales en células polarizadas MDCK-1 (“Madin-Darby canine kidney”) (Connolly-Andersen y cols., 2007). En otro miembro de la familia *Bunyaviridae*, el VFVR, la liberación de los nuevos virus ocurre tanto en regiones apicales como basolaterales de la membrana plasmática en células Caco-2 (células epiteliales derivadas de adenocarcinoma de colorrectal) (Gerrard y cols., 2002).

6. Transmisión viral célula-célula.

Los virus pueden diseminarse utilizando varios mecanismos. El mismo virus puede liberarse de regiones diferentes según el tipo de célula e incluso pueden insertar su genoma en el genoma celular y transmitirse por el ciclo lisogénico sin producir descendencia de nuevos virus. No está totalmente caracterizado el mecanismo de la propagación de virus entre células epiteliales de las mucosas del aparato respiratorio, digestivo y excretor (Burckhardt y Greber, 2009).

Existen virus que se transmiten por sinapsis virales, como es el VIH-1. Estas sinapsis virales son uniones establecidas entre la membrana plasmática de la célula infectada y la de la célula que va a ser infectada (Vasiliver-Shamis y cols., 2009). De hecho utilizando este mecanismo, la transmisión célula a célula para este virus se ha demostrado que es 18.000 veces más eficiente que la infección de viriones libres (Sowinski y cols., 2008; Chen y cols., 2007). Son las sinapsis virales y el

citoesqueleto de actina facilitan la entrada del virus VIH-1 en la célula receptora (Liu y cols., 2009; Vasiliver-Shamis y cols., 2009).

Cuando las partículas maduras intracelulares del virus vaccinia alcanzan la membrana plasmática y salen de la célula, provocan la polimerización localizada de actina que forma una “cometa” y que transporta a los virus de una célula a otra (Hollinshead y cols., 2001; Rietdorf y cols., 2001). La formación de esta cometa de actina ocurre justo debajo de las partículas virales denominadas “virus con envuelta asociados a células”, (Hollinshead y cols., 2001; Rietdorf y cols., 2001; van Eijl y cols., 2000). La formación de cometas es dependiente de la familia de tirosina-quinasa-Src y de la fosforilación de la proteína de membrana A36R situada en los virus maduros intracelulares (Frischknecht y cols., 1999).

Estudios recientes han demostrado que miembros de la familia *Reoviridae* como es el caso del virus de la enfermedad de lengua azul en rumiantes, (BTV del inglés “Blue tongue virus”), interactúa con vimentina a través de su nucleocápsida para la liberación de las partículas virales de la célula infectada (Bhattacharya y Roy, 2008).

7. Estructuras adhesivas en seres vivos.

Gracias a los estudios de cortes orientados de monocapas de células BHK-21 mediante MET, se observó que la liberación del VBUN ocurría principalmente en zonas basales de la célula. Curiosamente en estas zonas observamos la aparición de unas estructuras membranosas no descritas con anterioridad en la Bibliografía. La organización multilamelar altamente ordenada de estas estructuras y su disposición basal hizo pensar en una posible función relacionada con la adhesividad celular.

7.1. Animales con diseños estructurales únicos de adhesividad.

La habilidad de varios insectos y de los gecónidos o geos de unirse y despegarse rápidamente de distintos tipos de superficies ha atraído el interés científico (Autumn y cols., 2002). Aunque la morfología de los dedos de los animales anteriormente comentados es variable, en la mayoría de los casos presentan pequeños pelos que cubren la superficie del pie formando almohadillas, denominadas setas (Kim y Bhushan, 2007). La estrategia adhesiva de los geos reside precisamente en las setas, cada una de las cuales se subdivide en terminaciones (espátulas) de aproximadamente 200 nm de longitud. Las terminaciones de cada espátula presentan una longitud de 0,5 μm , 0,2-0,3 μm de anchura y un espaciado entre ellas de 0,01 μm (Kim y Bhushan, 2007). La extraordinaria capacidad de los pies de los geos motivó su estudio morfológico, en el que se ha basado el diseño de nuevos bio-polímeros de uso industrial (Mahdavi y cols., 2008). Diferentes especies de geos presentan diferentes tamaños y estructuras de setas (Rubial y Ernst, 1965). El pie de un *Tokay gecko* o *Gekko gecko* contiene alrededor de 5000 setas/ mm^2 (Rubial y Ernst, 1965) y puede generar una fuerza de 10 Newtons con aproximadamente 100 mm^2 de almohadilla de sus pies. Por lo que cada seta podría producir una media de 20 $\mu\text{Newtons}$ (Autumn y cols., 2000), fuerza vertical requerida para empujar al lagarto en una superficie vertical de 85° (Irschick y cols., 1996). Cada seta en esta especie de geco aproximadamente presenta 110 nm de longitud y 5 nm de diámetro (Rubial y Ernst, 1965). Utilizando setas, se genera un íntimo contacto con el sustrato, proporcionando suficiente fuerza de adhesión para poder escalar y arrastrarse en un amplio rango de superficies en la naturaleza para,

después, desprenderse rápidamente (Kim y Bhushan, 2007). Sin embargo, la adhesión de una espátula individualmente varía en función de la humedad y se reduce dramáticamente bajo el agua (Sun y cols., 2005), sugiriendo algún tipo de contribución por fuerzas de capilaridad (Lee y cols., 2007). De hecho se trata de un diseño único de la naturaleza en ausencia de sustancias pegajosas (Lee y cols., 2007; Kim y Bhushan, 2007) o fluidos para explicar la capacidad adhesiva de estos animales, que se basa en fuerzas físicas de Van der Waals y fuerzas capilares (Sun y cols., 2005). Aunque la fuerza de adhesión desarrollada por cada espátula es firme, también es temporal, permitiendo un rápido desprendimiento del pie del geco durante la locomoción (Lee y cols., 2007). Las espátulas se juntan o se separan para adherirse o desprenderse del sustrato. El papel de estos pelos ha sido descubierto recientemente. Basado en el mecanismo de contacto descrito por Johnson, Kendall y Roberts (JKR), teóricamente la división del área de contacto en un número de subdivisiones n aumenta la adhesión también en un factor n (del Campo y Arzt, 2007). Este principio se denomina “incremento de adhesión por división de contacto” y parece explicar cuantitativamente por qué animales más pesados (como p.ej., geos) están equipados con mayor densidad de pelos más cortos en sus patas que especies menos pesadas (p.ej., moscas) (Arzt y cols., 2003). Un modelo extraordinario de adhesión en ambientes húmedos sin desarrollar setas lo representan los mejillones, pudiendo escalar en superficies mojadas (Waite, 2002). Los mejillones segregan un tipo especial de proteínas adhesivas que contienen niveles altos del aminoácido 3,4-dihidroxi-fenilalanina catecol (DOPA) (Waite y cols., 2001).

8. Contacto célula-sustrato.

La mayoría de las células en cultivo se adhieren fuertemente al sustrato sobre el que crecen a través de adhesiones focales, contactos focales o placas de adhesión (Popper y cols., 2007; Burridge y cols., 1988; Abercrombie y cols., 1971).

En la Tabla I-2 se muestran distintos mecanismos de contacto de las células en cultivo con el sustrato.

Tabla I-2 Tipos de contactos célula-sustrato. En la primera columna se recogen los tipos de contactos celulares con el sustrato: Adhesiones focales, Filopodio, Lamelipodia, Podosomas e Invadipodia. En la segunda columna se recogen las proteínas implicadas en cada tipo de unión. En el resto, se recoge información sobre longitud, grosor, anchura, número por célula y función biológica.

Unión con sustrato	Proteínas implicadas	Longitud	Anchura	Función
Adhesiones focales	Integrinas, fimbrina, colágeno, laminina y vitronectina, (componentes de la matriz extracelular). Vinculina, talina, paxilina, α -actinina y quinasa p125 (Yamada y Miyamoto, 1995).	2-10 μ m.	\sim 0,5 μ m (Striker y cols., 2010).	Primeras estructuras subcelulares que regulan los efectos de adhesión de la matriz extracelular sobre el comportamiento celular a través de conexiones con el citoesqueleto de actina (Chen y cols., 2003). Además regulan señales bioquímicas para diversos procesos de regulación de su propio ensamblaje y desensamblaje (Schwartz y Ginsberg, 2002; Geiger y Bershadsky, 2002).
Filopodio	Haces de actina, fimbrina (Hanein y cols., 1997) y Cdc42 (Hall, 1998). Proteínas de unión a actina, familia ENA/VASP, CD42, miosina X, fascina, Dia2, complejo Arp2/3, IRSp53, WASP/WAVE y rif (Matilla y Lappalainen, 2008).	Varias micras.	60-90 nm.	Finas extensiones citoplasmáticas desde el borde de la membrana plasmática en células en movimiento. También están relacionados con la adhesividad celular y con las uniones adherentes (Mattila y Lappalainen, 2008).
Lamelipodia	Haces de actina dispuestos bidimensionalmente (Small y cols., 2002). N-WASP Rac y Cdc42 complejo Arp2/3 y proteína Rac.	Varias micras.	200-300 nm (Alberts y cols., 2002).	Movilidad celular, procesos de fagocitosis, desarrollo de sitios o focos de adhesión celular y organización de los dominios de membrana (Alberts y cols., 2002; Small y cols., 2002).
Podosoma e invadipodia	Podosomas: actina, N-WASP, WIP, Arp2/3 o cortactina, tirosín-quinasas, PI3K, PKC y GTPasas de la familia Rho, Rac y Cdc42 (Linder y Aepfelbacher, 2003; Buccione y cols., 2004; Linder, 2007). Núcleo de actina paxilina o vinculina. Los microtúbulos forman parte del mantenimiento y renovación de estas estructuras (Linder, 2007). Invadipodia: Actina (Buccione y cols., 2004), cortactina y el complejo proteico Arp2/3 (Clark y cols., 2007).	Podosomas: 200–500 nm (Buccione y cols., 2004). Invadipodia: > 5 μ m (Schoumache y cols., 2010).	Podosomas: 0,5 μ m (Linder, 2007). Invadipodia: 0,5 a 2 μ m (Schoumache y cols., 2010).	Podosomas: Estructuras celulares que establecen íntimos contactos con la matriz extracelular degradando componentes de la propia matriz extracelular concentrando metaloproteasas (Gimona y cols., 2008; Linder, 2007). Invadipodia: Estructuras claves para la invasión celular, degradando componentes de la matriz extracelular concentrando metaloproteasas (Linder, 2007).

9. Contactos célula-célula y célula-matriz extracelular.

La adhesión física de las células con la matriz extracelular (uniones tipo adherentes) juega un importante papel en el mantenimiento de los tejidos. Las uniones adherentes mejor caracterizadas son los desmosomas, hemidesmosomas y las uniones estrechas de las células epiteliales denominadas desmosoma en banda o *zonula adherens* (Borrmann y cols., 2000). En la Tabla I-3 se recogen los principales tipos de conexión entre células y sus principales características. Los desmosomas son estructuras de unión altamente especializadas que forman una fuerte conexión entre las células epiteliales y los miocitos cardíacos (Schwarz y cols., 1990). Los hemidesmosomas son complejos multiproteicos que sujetan las proteínas epiteliales a la matriz actuando como coraza para la inserción del citoesqueleto de actina.

Tabla I-3 Uniones intercelulares de adhesión. Uniones de anclaje (Desmosomas, hemidesmosomas), uniones comunicantes (“gap junction”) y uniones estrechas (“tight junction”).

Uniones de adhesión	Proteínas relacionadas	Localización	Función
Desmosoma	Cadherinas, placoglobina, desmoplaquinas, placofilina, glicoproteínas transmembrana y citoqueratinas (una clase de filamentos intermedios) (Garrod, 1993).	Zonas basolaterales de las células epiteliales y los miocitos cardíacos.	Unen las células del epitelio a través de los filamentos intermedios de las células vecinas (Kowalczyk y cols., 1999).
Hemidesmosoma	Integrina $\alpha 6 \beta$ y haces de queratinas (Hopkinson y Jones, 2000).	En contacto con la lámina basal en células epiteliales.	Unen las células epiteliales a la matriz formando una coraza donde se inserta el citoesqueleto de actina (Schwarz y cols., 1990).
Unión comunicantes o “gap junction”	Proteínas pertenecientes a la familia de conexinas (Kumar y Gilula, 1986), (Chen y cols., 2011).	Músculo cardíaco, neuronas y en retina.	Conectan el citoplasma de dos células permitiendo el intercambio de iones y moléculas así como la comunicación eléctrica (Lampe y Lau, 2004).
Uniones estrechas o “tight junction”	Ocludina, actina, claudina y moléculas de uniones estrecha y kinasas (MAGUK) (Tsukita y cols., 2001). Proteínas tipo ZO-1 (ZO-2, ZO-3, AF6 y cingulina) (Anderson, 2001).	Dominio basolateral de células epiteliales.	Mantienen unidas las células formando una barrera impermeable a fluidos, favoreciendo la polaridad celular al evitar la difusión de proteínas integrales de membrana entre los dominios apicales y baso-laterales de la célula.

10. Alteración de proteínas relacionadas con la adhesividad celular durante las infecciones virales.

La adhesión celular es un requerimiento indispensable para que cada célula pueda organizarse tridimensionalmente en los tejidos (Gumbiner, 1996). Las proteínas responsables de la capacidad adherente son: 1) Glicoproteínas transmembranas (en contactos célula-célula, caderinas) o integrinas (contactos con la matriz extracelular). 2) Proteínas de matriz extracelular, largas glicoproteínas (colágeno) unidas fuertemente a receptores de adhesión. 3) Proteínas de la placa citoplasmática o periféricas de membrana, como catenina en los contactos célula-célula (Gumbiner, 1996).

Las infecciones virales pueden alterar la distribución intracelular de proteínas contráctiles. El virus del Sarcoma de Rous (VRS) cambia la distribución de actina, miosina y tropomiosina (Tanaka y cols., 1993). Como consecuencia, las células se redondean. Además estructuras adhesivas estables, como adhesiones focales y distintas estructuras adhesivas, como las rosetas (David-Pfeuty y Singer, 1980), podosomas (Tarone y cols., 1985) o contactos motiles (Sobue, 1990), se forman de *novo*. También existe reorganización de vinculina, actina α (David-Pfeuty y Singer, 1980), y talina (Burridge y Connel, 1983). Recientemente se han descrito alteraciones en uniones estrechas y uniones adherentes de células epiteliales nasales humanas infectadas con Rhinovirus (Yeo y Jang, 2010). El VIH-1 provoca el reclutamiento de moléculas de adhesión y reorganización del citoesqueleto de actina para favorecer la infección (Perry y cols., 2005). Las integrinas son proteínas heterodiméricas con dominios transmembrana y citosólicos que regulan interacciones célula-sustrato y célula-célula (Hynes, 1992). Los *Papilomavirus* provocan una alteración del dominio β de la integrina $\alpha_6 \beta_4$ (Oldak y cols., 2006).

11. Citoesqueleto celular e infecciones virales.

La actina es una proteína que, en muchas ocasiones, se altera en las infecciones virales, como en el caso del virus de la rabia (Ceccaldi y cols., 1997). Este virus provoca desensamblaje de actina en fibroblastos (Simon y cols., 1990). En la infección provocada por el virus de la leucemia murina, VLM, también disminuyen las fibras de estrés (Luftig y Lupo, 1994). Se han observado alteraciones en el ensamblaje de actina y proteínas de unión a actina en células endoteliales humanas infectadas por el virus del Dengue (Kanlaya y cols., 2009). En células infectadas por *Hantavirus* la actina es clave para el ensamblaje y la liberación de los nuevos virus (Ravkov y cols., 1998) y los microtúbulos son importantes para la replicación viral en *Hantavirus* (Ramanathan y Jonsson, 2008). En el movimiento de la proteína N de *Hantavirus* interviene una pequeña GTPasa (dinamina) que actuaría como motor molecular (Ramanathan y Jonsson, 2008). Estudios más recientes con el VBUN han demostrado la presencia de la actina en virus intracelulares y en el complejo replicativo, pero no en virus extracelulares (Fontana y cols., 2008).

12. Alteración de la membrana plasmática durante infecciones virales.

Tanto las etapas iniciales como las finales de la infección viral están relacionadas con la membrana plasmática (Roizman, 1990). Los virus sobre la membrana se pueden mover lateralmente e interactuar con receptores específicos (Burckhardt y Greber, 2009). En células infectadas se han observado alteraciones en el reconocimiento y transporte molecular, transducción de señales y mantenimiento de los flujos iónicos. En células infectadas con virus de la familia *Bunyaviridae* se han detectado alteraciones en las bombas de sodio, potasio y calcio (Frugulhetti y Rebello, 1989).

La adhesión celular y la movilidad juegan un papel central en diferentes fenómenos biológicos, pero ambos acontecimientos están vinculados con la extensión de la membrana plasmática (Raucher y Sheetz, 2000a). En los denominados reservorios de membrana existe membrana disponible para desplegarse rápidamente (Hochmuth y cols., 1999). En células nerviosas, musculares y epiteliales se han detectado adición de membrana desde reservas intracelulares cuando aumenta el tamaño de la célula por perturbaciones osmóticas y reabsorción de restos de membranas que ya no son necesarias (Fisher y cols., 2004). Estos mismos autores demostraron que en células epiteliales tipo 2 existe inserción de lípidos en la membrana plasmática, independientemente de la integridad del citoesqueleto de actina, disponibilidad de ATP o señalización mediada por calcio.

Materiales y métodos

1. Células y virus.

Se usaron células BHK-21 (CCL-10), MRC-5 (CCL-171) y Hep-2 (CCL-23) procedentes de la colección ATCC (“American Type Culture Collection”). Virus Bunyamwera (BR-87) también procedente de la ATCC. Virus quimera VBUN-GFP-NSm, expresando la proteína fluorescente GFP (“Green Fluorescence Protein”) y fusionada en el segmento M, rBUNM-NSm-EGFP generado por genética inversa (Shi y cols., 2006) cedido por Dr. R.M. Elliott (University of St. Andrews, Escocia).

Las células BHK-21, MRC-5 y Hep2 fueron crecidas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, del inglés “Dulbecco's Modified Eagle's Medium”, Sigma) con una concentración de glucosa de 4,5 g/l, suplementado con aminoácidos no esenciales (Sigma), glutamina (Sigma) a una concentración de 200 mM, gentamicina (Sigma) a 50 µg/ml, penicilina (Sigma) a 100 U/ml, estreptomicina (Sigma) a 100 µg/ml y suero fetal bovino al 10% (FBS, del inglés “fetal bovine serum”, Reactiva S.A.).

2. Sondas, anticuerpos, tampones y fijadores para microscopía.

Sondas:

- Marcadores de actina: Phalloidin (Faloidina) Alexa (488) y Phalloidin Alexa (660) de Invitrogen.
- Marcadores de membrana plasmática: FM[®]1-43FX (FM[®]1-43FX “fixable analog of FM[®]1-43 membrane stain”, Invitrogen) y WGA Alexa Invitrogen 594 y 647, (Molecular Probes).
- Marcadores de ácidos nucleicos: ToPro (Sigma-Aldrich Co.) y DAPI, del inglés 4',6- diamidino-2-phenylindole, (Sigma-Aldrich Co.).
- Marcadores de lisosomas: Lysotracker[®] RED DND-99 1 mM en DMSO, (Invitrogen).
- Marcadores de mitocondria: Mitotracker[®] Deep-Red 633 en DMSO (M-22426) y Mitotracker[®] Green en DMSO (M-7514), (Molecular Probes).
- Marcadores de vesículas acídicas y autofagosomas: monodansilcadaverina (MDC-D113), (Molecular Probes/Invitrogen Corp.).

Anticuerpos contra proteínas virales:

- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-Gc (MAB742), descrito por Lappin y cols., 1994 y cedido por Dr. R.M. Elliott (University of St. Andrews, Escocia).
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-VBUN procedente de Dr. R.M. Elliot, (University of St. Andrews, Escocia).
- Anticuerpo policlonal de conejo contra la nucleocápsida, anti-N, generado mediante inmunización con el péptido sintético MIELEFHDVAANTSST correspondiente a la región amino-terminal (Fontana y cols., 2008).
- Anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína no estructural NSm, anti-NSm, desarrollado contra el péptido TDQKYTLDEIADVLQA (equivalente a los residuos 338 al 353 del segmento M), Nakitare y Elliott, 1993. Cedido por Dr. R.M. Elliott, (University of St. Andrews, Escocia).

Anticuerpos contra proteínas celulares:

- Anticuerpos de ratón: anti- β -tubulin (T4026, Sigma) y anti-vimentina V9 (V-6630, Sigma).
- Anticuerpos de conejo: α -PDI, (proteína disulfuro isomerasa del inglés “Protein Disulfide Isomerase”, (P7372, Sigma).

Anticuerpos comprados o cedidos:

- Anti- β -actina monoclonal (ratón), (AC-15, Sigma).
- Anti-RhoA monoclonal isotipo IgG₁ (ratón), Santa Cruz Biotechnology.
- Anticuerpo específico para el aparato de Golgi (regiones *cis-media* Golgi), anti-Gigantina N-terminal (1-469) (policlonal de conejo) (Covane-atom S.A.).
- Anti-dinamina (policlonal de conejo) (ab3457, Abcam).
- Anti-mitofusina (policlonal de conejo) (ab50838, Abcam).
- Anti-vinculina humana isotipo IgG1 (monoclonal de ratón) (clon hVIN-1, Sigma).
- Anti-cortactina (p80/85) (monoclonal de ratón), (clon 4F11, Millipore).
- Anti-N-WASP (H-100, policlonal de conejo), (sc-2070, Santa Cruz Biotechnology).
- Anti-paxilina (pollo), (BD Transduction Laboratories).
- Anti-gamma tubulina (policlonal de conejo) (ab1131, Abcam).
- Anti-TGN-46 (policlonal de conejo), marcador humano de regiones *trans*-Golgi, (AbD-Serotec).
- Anti-TGN-38 (policlonal de conejo), proteína transmembrana de la región *trans*-Golgi, Wilde y cols (1992).
- Anti-Lamp-1 (policlonal de conejo), marcador de lisosomas cedido por Dr. Sven Carlsson, Universidad de Umea, Suiza.
- Anti-CD63 Dy634, marcador de endosomas tardíos, cuerpos multivesiculares y lisosomas (Inmunostep).
- Anti-CD63 Human (monoclonal de ratón), marcador de endosomas tardíos, cuerpos multivesiculares y lisosomas, CD63-APC, (Inmunostep).
- Anti-clatrina (policlonal de conejo), (BD Biosciences).
- Anti-LC3 (policlonal de conejo), marcador específico de autofagosomas (Nanotools Antibodies).
- Anti-integrina β 5 (monoclonal de ratón), (ab55359, Abcam).
- Anti-integrina α 5 (policlonal de conejo), (ab55991, Abcam).
- Anti-integrina α 4 (monoclonal de ratón) cedido por el grupo del Dr. Sánchez-Madrid, Hospital de la Princesa, Madrid.

Otros anticuerpos primarios:

- Anticuerpo contra ARN de doble cadena anti-ARNds J2 (policlonal de conejo), English and Scientific Consulting (Hungría).
- Anticuerpo contra Bromouridina (policlonal de conejo), Sigma-Aldrich Co.

Anticuerpos secundarios:

- Los anticuerpos secundarios anti-ratón fueron: anti-ratón verde 488 (A1102, Invitrogen), anti-ratón rojo 594 (A21203, Invitrogen) y anti-ratón azul Cy5 (Jackson Immnoresearch, Formigen).
- Los anticuerpos secundarios anti-conejo fueron: anti-conejo verde 488 (A-210206, Invitrogen), anti-conejo rojo 594 (A-21207, Invitrogen).
- El anticuerpo secundario anti-pollo fue: anti-pollo rojo 594, (Molecular Probes).
- Los anticuerpos secundarios conjugados con oro coloidal utilizados en inmunomarcajes en cortes de células incluidas en la resina LR-WhiteTM fueron adquiridos de BioCell International.
- Los anticuerpos secundarios asociados a peroxidasa de nabo para su uso en Western Blot fueron comprados a Amersham-Bioscience.

Otros:

- Bromouridina (850187), Sigma-Aldrich Co.
- Actinomicina-D, Sigma-Aldrich Co.
- Citocalasina-D, Sigma-Aldrich Co.
- 3-Metiladenina (3-MA), Sigma-Aldrich Co.
- Inhibidores de Proteasas, Roche Molecular Biochemicals.
- Kit ECL, Amersham-Bioscience.
- Tripsina-EDTA, 0,1 M (Tripsina al 0,25% y EDTA al 0,02% en PBSx1).
- Tween 20[®], (TAAB).
- Ácido tánico, (TAAB).
- Glutaraldehído, (TAAB).
- Tetróxido de Osmio, (TAAB).
- Ferricianuro Potásico, (Sigma).
- Medio montaje, Prolong Gold, (Molecular Probes/Invitrogen Corp.).
- Formvar, (TAAB).
- Acetato de uranilo, (TAAB).
- Saponina, (Sigma).
- Marcadores de peso moleculares (coloreados), (Bio-Rad).
- Películas fotosensibles para Western Blot, (Kodak[®]).

Tampones:

- Tampón de citoesqueleto (para inmunofluorescencias), 1 mM pH 6,1: 150 mM NaCl; 10 mM MES; 5 mM MgCl; 5 mM EGTA; 5 mM Glucosa.
- PBS (del ingles "Phospahte buffered saline"), 1 mM pH 7,2-7,4: 0,273 M NaCl; 0,053 M ClK; 0,032 M Na₂HPO₄x12H₂O; 3 mM KH₂PO₄.
- PBS-Tween 0, 1%: PBS 1 mM pH 7,2-7,4, 100 ml de Tween 20[®].
- PBS-Tween 0, 3%: PBS 1 mM pH 7,2-7,4, 300 ml de Tween 20[®].
- HEPES (del inglés "4-(2-hydroxyethyl)-1-piperzineethanesulfonic acid") 0,4 M pH, 7,2-7,4.
- TBG, pH 7,8-8: 0,01 M Glicina, 0,15 M NaCl; 0,03 M Tris; 0,05gramos/50ml de BSA.
- Tris-HCl 0,01 M pH 7,4: 0,01 M NaCl; 0,01 M Tris; 2 ml EDTA al 0,5 M.
- TEN 10 mM pH 7,4: NaCl 0,1 M; 0,01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA.

- Tampón RIPA pH 8,0: 1% NP40; 0,1% Sodio de Sodiodeoxicolato; 0,1% SDS al 10%; 150 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl; 2 mM EDTA.
- Tampón Laemmli5: 0,0625 M Tris-HCl a pH 6,8; SDS al 2 %; 5% beta-mercaptoetanol; 10 % glicerol; 0,002 % azul de bromofenol.
- Tampón para geles de poliacrilamida al 10 %: PBSx10 y SDS al 10 %.
- Tampón de transferencia de membranas para Western blot, pH 9-9,4: 0,047 M Tris Base; 0,038 gr Glicina; 0,75 ml de SDS al 10%; 20% metanol.
- Tampón de bloqueo para Western blot, para 500 mL 15 gr de leche, 50 ml de PBSx10 y 250 µl de Tween 20[®].

Fijadores:

- Fijador para microscopía óptica de fluorescencia: Paraformaldehído al 4% en PBSx1, (la fijación se realiza a temperatura ambiente durante 30 min).
- Fijador para monocapas para realizar titulaciones virales: Formaldehído al 10% en PBSx1, (la fijación se realiza a temperatura ambiente durante 1 hora).
- Fijador para monocapas incluidas en resina Epoxi EML-812: Tampón HEPES 0,4 M pH 7,2-7,4, glutaraldehído al 1% y ácido tánico al 0,5% (la fijación se realiza a temperatura ambiente 2-3 horas).
- Fijador para monocapas incluidas en resina LR-WhiteTM: Glutaraldehído al 0,1% y PFA al 4% (la fijación se realiza a 4°C durante 1 hora).

3. Titulación del virus VBUN.

3.1. Células BHK-21.

Los experimentos de titulación del VBUN se realizaron infectando monocapas de células BHK-21 con diluciones decimales del stock viral para titular, en medio de cultivo DMEM suplementado con FBS al 2%, para posteriormente, incubar las células en medio sólido (empleando agar al 0,6%). Transcurridas 50 horas post-infección, las células se fijaron 1 hora con formaldehído al 10% en PBSx1. Posteriormente, se retiró el medio y se contaron las placas de lisis formadas tiñendo las células no infectadas con cristal violeta al 0,1% en metanol-agua (20:80). Finalmente, se hizo recuento de las placas de lisis.

3.2. Células MRC-5.

Los experimentos de titulación de un stock generado en células BHK-21 del virus VBUN en células MRC-5 se realizaron por recuento de focos de fluorescencia utilizando el anticuerpo contra la nucleocápsida viral, N-947 y anticuerpo secundario, anti-conejo 488. Transcurridos 3-5 días post-infección, las células MRC-5 se fijaron durante 1 hora con formaldehído al 10% en PBSx1 eliminando el agar. Se realizaron dos lavados en PBSx1 para eliminar restos del fijador y se realizó la detección de los focos fluorescentes. Para ello, se incubaron las células con el anticuerpo primario anti-N-947 (1:500) en PBSx1 con FBS al 3%, en leve agitación, durante 2-3 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, se realizaron 3 lavados en PBS-FBS al 3% de 5 min. Se incubaron las células con anticuerpo secundario anti-conejo 488 y protegidas de la luz, también en leve agitación. Por último, se realizaron tres lavados en PBSx1 de 10 min y se mantuvieron a 4°C protegidas de la luz hasta el recuento de los focos fluorescentes en el microscopio óptico.

3.3. Células HEp-2.

Se infectaron monocapas de células HEp-2 con virus VBUN generados en células BHK-21 con el medio de cultivo y FBS al 2%. Se recogieron los sobrenadantes y los extractos intracelulares de cada tiempo post-infección (por cada tiempo se hicieron dos réplicas). Los sobrenadantes y los extractos celulares se inocularon en diluciones decimales en células BHK-21 cultivadas en medio DMEM-FBS 2%. Posteriormente, se incubaron las células en medio sólido (empleando agar al 0,6%). Pasadas 50 horas post-infección, las células BHK-21 se fijaron 1 hora con formaldehído al 10% en PBSx1, se contaron las placas de lisis formadas tiñendo las células no infectadas con cristal violeta al 0,1% en metanol-agua (20:80) y se hizo recuento de las placas de lisis.

4. Infección del virus VBUN.

Las infecciones se realizaron en el laboratorio de nivel 2 de bioseguridad.

4.1. Células BHK-21.

Los experimentos de infección del VBUN en las células BHK-21, se realizaron infectando monocapas de células BHK-21 al 80% de confluencia aproximadamente, y utilizando una multiplicidad de infección de 1 unidad formadora de placa de lisis (UFP)/célula. Los tiempos de post-infección variaron desde las 5-6 horas hasta 25-30 horas.

4.2. Células MRC-5.

Los experimentos de infección del virus VBUN en las células MRC-5, se realizaron infectando monocapas de células MRC-5 al 80% de confluencia aproximadamente, utilizando una multiplicidad de infección de 1 unidad formadora de foco de fluorescencia (UFF)/ célula. Los tiempos de post-infección variaron desde las 3-5 horas hasta las 150 horas.

4.3. Células HEp-2.

Los experimentos de infección del VBUN en las células HEp-2, se realizaron infectando monocapas de células HEp-2 al 80% de confluencia aproximadamente, utilizando una multiplicidad de infección de 1, equivalente a la utilizada para células BHK-21. Los tiempos post-infección variaron desde 6 a 48 hpi.

5. Incorporación de Bromouridina.

El ARN viral recién sintetizado en células MRC-5 y HEp-2 infectadas por el VBUN, fue localizado entre las 4 y las 6 hpi empleando Bromouridina (BrU) a 5 mM durante 1 hora en incubación a 37°C. Previamente a la adición de BrU, se añadió durante 30 min actinomicina-D a 10µg/ml a 37°C (la actinomicina-D, se une al ADN al iniciarse la transcripción, evitando así la elongación por parte de las ARN polimerasa celulares). Después, las células se fijaron con PFA 4% y se mantuvieron en PBSx1 a 4°C. La detección de la BrU, se realizó mediante un anticuerpo policlonal anti-BrU en dilución 1:200, siguiendo un protocolo general de

inmunofluorescencia (ver apartado de Materiales y métodos “8.1 Inmunofluorescencia”).

6. Marcaje de autofagosomas y tratamiento con 3-metiladenina (3-MeA).

La sonda monodansilcadaverina (MDC) se acumula en los autofagosomas e interacciona con los lípidos presentes en las membranas de las vacuolas autofágicas (Niemann y cols., 2000; Biederbick y cols., 1995). Para marcar los autofagosomas, las células fueron tratadas 1 hora con MDC 10 μ M antes de su fijación, siguiendo el protocolo de Jackson y cols., 2005 (la fijación PFA al 4% durante 10 min a temperatura ambiente). Para inhibir la formación de los autofagosomas, se usó la droga 3-MeA (Stroikin y cols., 2004) a 10 mM, en células control e infectadas a 10 y 24 hpi. Se realizaron experimentos añadiendo la droga durante 1 hora o añadiéndola cada 2 horas hasta 10 y 24 hpi.

7. Tratamientos con drogas depolimerizantes de actina.

Se crecieron células BHK-21 y MRC-5 sobre cubreobjetos sonicados en etanol, hasta alcanzar una confluencia del 80%. Se infectaron a 0,01, 0,5 y 1 UFP/célula. Transcurrida la primera hora de adsorción viral, se añadió en el medio citocalasina-D a una concentración de 2 μ M, siguiendo el protocolo de Fontana y cols., 2008. Transcurridas 8, 10 y 14 hpi, se recogieron los sobrenadantes para su posterior titulación en células BHK-21. Las células tratadas con citocalasina-D, se fijaron con PFA al 4% durante 20 min a temperatura ambiente. Se retiró el fijador y las células se mantuvieron a 4°C en PBSx1 hasta su estudio por inmunofluorescencia.

8. Preparación de muestras para microscopía óptica de fluorescencia.

8.1. Inmunofluorescencia.

Los cubreobjetos con las células control e infectadas se mantuvieron en PBSx1 tras ser fijadas con PFA 4% durante 20 min a temperatura ambiente. Después se realizó un proceso de permeabilización durante 10 min con saponina al 0,25% diluida en PBSx1. Se bloquearon los posibles sitios inespecíficos usando suero de cabra al 2% y saponina al 0,25% en PBSx1 durante 40 min. La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante 1 hora con saponina y suero de cabra en las mismas concentraciones que durante la permeabilización. Seguidamente se realizaron tres lavados con PBSx1 de 5 min. La incubación del anticuerpo secundario se realizó durante 1 hora también con suero de cabra al 2% y saponina al 0,25%. Se realizaron tres lavados con PBSx1 de 5 min. Es importante en cada uno de los lavados, escurrir bien la muestra para eliminar restos que puedan generar fondos inespecíficos. Finalmente, se hizo el montaje del cubreobjetos con ProLong Gold (5-6 μ l) en portaobjetos y se preservó de la luz. Las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta que se fueran usadas en el microscopio de fluorescencia confocal Leica modelo TCS-SP5, equipado con cinco canales simultáneos (rojo, verde, azul, DAPI y campo claro), cámara para muestras con control de temperatura, CO₂, humedad y FRAP (“Fluorescent Recovery Alter Photobleaching”) y capacidad para estudios *in vivo*. También se usó el microscopio confocal Bio-Rad Radiance 2100 (Zeiss) para determinadas muestras. Este microscopio sólo presentó los tres canales típicos, rojo, azul y verde además del canal de DAPI (para marcar ácidos nucleicos). En las

inmunofluorescencias en las que no se retiró el medio de cultivo durante la fijación, se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente.

En el caso de las sondas WGA y de Faloidina, éstas se incubaron después que los anticuerpos secundarios. El DAPI y el ToPro se incubaron posteriormente a los anticuerpos secundarios, en pasos adicionales fueron diluidos en PBSx1, suero de cabra al 2% y saponina al 0,25% durante 20 min.

8.2. Sondas en célula viva.

Previamente a la fijación de las células control e infectadas, las células se incubaron con una dilución 1:200 de WGA 594 ó 647 (Alexa) en DMEM-FBS al 2% durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se fijaron las células con PFA al 4% durante 20 min a temperatura ambiente. Los cubreobjetos con las células fijadas se mantuvieron en PBSx1 hasta el momento de ser montados sobre un portaobjetos, añadiendo 3-4 µl de ProLong Gold.

Las sondas Lysotracker[®] y Mitotracker[®], se usaron en células vivas para detectar vesículas ácidas y mitocondrias, respectivamente. Las sondas se incubaron en el medio DMEM/FBS al 2% a 37°C, a una concentración de 200 mM (1:2000) durante 1 hora, según el protocolo de Fontana y cols., 2007. Posteriormente, se fijaron en PFA al 4% para continuar con el protocolo general descrito en el punto 8.1 “Inmunofluorescencia”, pero empleando suero de cabra al 0,2%.

8.2.1. Vídeo-microscopía de células control e infectadas utilizando la sonda WGA (Alexa).

El microscopio confocal TCS-SP5 (Leica) cuenta con reguladores de CO₂, humedad y temperatura, para estudiar células vivas. La vídeo-microscopía, microscopía correlativa y microscopía electrónica se pueden combinar permitiendo estudios dinámicos *in vivo* y la obtención de información ultraestructural de las mismas células (Polishchuk y Mironov, 2001).

En placas p-36 MatTek Corporation Glass Bottom Cultured Dished[®] (especiales para la pletina del microscopio TCS-SP5 -Leica-), se crecieron células BHK-21 (pase entre el sexto y décimo) en medio DMEM-FBS al 10% al 80 % de confluencia en presencia o en ausencia de una dilución 1:200 de la sonda WGA. Todas las infecciones se hicieron a 1 UFP/célula. Se hicieron tres tipos de ensayos en microscopio de confocal TCS-SP-5 (Leica):

- Células BHK-21 crecidas en presencia de WGA 1:200 durante 20 min y mantenidas en medio DMEM-FBS al 10% durante 24 horas. Posteriormente, infectadas a 1 UFP/célula durante 10 horas.
- Células BHK-21 crecidas en DMEM-FBS al 10% infectadas a 1 UFP/célula 24 hpi. Durante la primera hora de adsorción viral se añadió la sonda WGA 1:200 a 37°C y a 95% humedad.
- Células BHK-21 crecidas en DMEM-FBS al 10% infectadas a 1 UFP/célula 24 hpi a 37°C y a 95% de humedad. Después de la hora de adsorción viral, se añadió la sonda WGA 1:200 durante 20 min.

En el caso del primer ensayo, se tomaron imágenes antes de la infección como control de la fluorescencia. Durante la hora de adsorción viral se tomaron imágenes a los 15, 20, 45 y 55 min. En el segundo ensayo, se tomaron imágenes

durante primera hora de adsorción viral a los mismos tiempos. En el tercer caso, se seleccionaron las posiciones celulares transcurrida la hora de adsorción viral y los 20 min de marcaje con WGA. En los tres ensayos, después de la hora de adsorción viral, se hicieron varios lavados con medio para eliminar posibles virus en el sobrenadante. Las células recién infectadas se mantuvieron con 2 ml de DMEM-FBS al 2%. Se seleccionaron unas 15 posiciones por placa y se tomaron imágenes cada 30 min durante 10 horas de cada una de ellas. En el segundo y tercer ensayo se volvió a añadir WGA 1:200 a las 21 hpi.

8.2.2. Vídeo-microscopía de células control e infectadas utilizando Mitotracker[®].

Se realizaron dos experimentos de vídeo-microscopía de células BHK-21 vivas. En ambos se utilizaron dos placas p-36 Mateck[®] en las que se crecieron células en una dilución 1:10, hasta alcanzar una confluencia aproximada del 80%. Una de las placas fue el control sin infectar. La otra placa, se infectó a 5 UFP/célula. Transcurrida la hora de adsorción viral a 37°C, se retiró el inóculo y se sustituyó por medio DMEM-FBS al 2% con Mitotracker[®] 200 mM durante 45 min a 37°C y en agitación cada 15 min (Fontana y cols., 2007). Posteriormente, ambas placas se colocaron en el microscopio TCS-SP-5 (Leica) y se seleccionaron 10 posiciones de células control e infectadas. Se tomaron imágenes de cada una de las posiciones cada 15 min hasta 18 hpi. Las imágenes procedentes de los vídeos de vídeo-microscopía de células BHK-21 vivas fueron realizadas con el programa informático LAS AF (del inglés “Leica Application Suite Advanced Fluorence”).

9. Reconstrucción tridimensional a partir de microscopía confocal.

Los planos obtenidos en el microscopio TCS-SP-5 (Leica) fueron procesados para obtener proyecciones laterales con el programa informático LAS AF. Los planos obtenidos en el microscopio confocal Bio-Rad Radiance 2100, se procesaron con el programa informático IMAGE J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

10. Estudio de monocapas orientadas e infectadas para MET.

Las células BHK-21 se crecieron en placas de cultivo P-100 (Falcon) en medio DMEM complementado con aminoácidos esenciales (Sigma-Aldrich), glutamina (200 mM), gentamicina (50 µg/ml), penicilina (100 µg/ml) y FBS al 10%.

Las infecciones se realizaron infectando a 1 UFP/célula en medio DMEM-FBS al 2%. Durante las horas de infección (10-16 hpi), las células infectadas se dejaron a 37°C en incubador modelo Termo Electrón Corporation HEPA class 100. Después, las células se fijaron con PFA al 4% (para estudios de inmunofluorescencias) o con 0,5% de ácido tánico y 1% de glutaraldehído en tampón HEPES 0,4M pH 7,2 (para estudios de ultraestructura y MET, células crecidas en Thermanox[®] Plastic Coverslips (Nunc) (10,5x22 mm Rochester) o con glutaraldehído al 0,1% y PFA al 4% (para inmunomarcajes en la resina LR-White) . Los lavados para las muestras de inmunofluorescencia se realizaron con PBSx1 y para las muestras de MET en HEPES 0,4 M pH 7,2.

10.1. Inclusión en epoxi-resina EML-812.

Las células control e infectadas crecidas en Thermanox[®] (Nunc) Plastic Coverslips (10,5x22 mm Rochester), se procesaron modificando parte del protocolo presentado por Novoa y cols., 2005b. Las láminas de Thermanox[®] fijadas se mantuvieron en HEPES 0,4 M pH 7,2. Se realizó una fijación de lípidos con tretóxido de osmio al 1% (TAAB) y ferricianuro potásico (Sigma) al 0,8% durante 1 hora a 4°C. Posteriormente, se realizó una nueva fijación de lípidos con acetato de uranilo al 2% (40 min a 4°C) y se deshidrató la muestra con concentraciones crecientes de acetona (50, 70, 90 y 100%) durante 10 min por incubación a 4°C. La última infiltración se hizo con acetona-Epon al 50%, dejándose toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se cambió la mezcla acetona-Epon, por una mezcla de resina al 100% y al cabo de otras 24 horas se volvió a cambiar la resina. En este último paso, se polimerizó a 60°C durante tres días las muestras en moldes planos. Tras los tres días de polimerización, las muestras se pudieron procesar en el ultramicrotomo Ultracut EM-UC6 (Leica).

10.2. Obtención de cortes ultrafinos seriados para MET.

Las muestras polimerizadas se cortaron en ultramicrotomo Ultracut EM-UC6 (Leica) y cuchilla de diamante (Diatome Ltd.) obteniéndose, así secciones ultrafinas de 70-90 nm de grosor (estimado por el color del corte). La monocapa fue reorientada de tal forma que se seccionara paralela al sustrato de las mismas, comenzando por la parte basal (Fontana y cols., 2007, 2008).

Al tratarse de cortes seriados, fue importante intentar obtener todos los cortes de las zonas basales, donde sabemos que están las estructuras de interés. Se recogieron con un Perfect Loop (Diatome Ltd.) previamente sonicado durante 5 min y se depositaron sobre rejillas especiales para seriados de 50 GP (TAAB) cubiertas con formvar-carbón. Se tomaron cortes desde zonas basales hasta las zonas más apicales (por encima de 6 µm en células BHK-21 y MRC-5 y hasta 25-30 µm para células HEp-2).

Las muestras se tiñeron con acetato de uranilo saturado durante 20 min, y con citrato de plomo durante 2-3 min (entre ambos pasos y al final de la tinción se hicieron lavados con agua destilada). Posteriormente, las rejillas fueron estudiadas en un microscopio electrónico modelo JEM 1011 (JEOL) que opera a 100 Kv.

10.3. Seguimiento de los cortes de la serie en la rejilla en el MET.

Una vez fotografiada la zona de interés común en todos los cortes de la serie, se escanearon los negativos en un escáner Perfection 3170 PHOTO (EPSON) a 600 píxel por pulgada (ppp) o se tomó una imagen instantánea con la cámara digital modelo Gatan Inc. acoplada al microscopio JEOL.

10.4. Inclusión de células en epoxi-resina EML-812 sin eliminar el medio de cultivo.

Se siguió el mismo protocolo que en el apartado de Materiales y métodos “10.1. Inclusión en epoxi-resina EML-812”, pero sin eliminar el medio de cultivo durante la fijación con glutaraldehído al 1% y ácido tánico al 0,5%, de forma que se consigue así, preservar estructuras muy lábiles.

10.5. Inclusión en resina acrílica LR-WhiteTM

Las células control e infectadas fueron crecidas en Thermanox[®] (Nunc) Plastic Coverslips (10,5x22 mm Rochester). La fijación fue realizada a 4°C durante 1 hora con una mezcla de glutaraldehído al 0,1% con PFA al 4%. Se realizaron 3 lavados a 4°C en PBSx1 y se mantuvieron las muestras fijadas a 4°C. La deshidratación se realizó también a 4°C con concentraciones crecientes de etanol cada 5 min (30, 50, 70 y 100% etanol), excepto con la última concentración de etanol al 100%, en cuyo caso la incubación fue de 10 min. La infiltración se realizó a temperatura ambiente, primero en mezcla LR-WhiteTM (London Resin Company Limited)-Etanol (1:1), después 1 hora sólo con LR-WhiteTM y por último, toda la noche en LR-WhiteTM a temperatura ambiente y en campana extractora. El segundo día de infiltración se cambió la resina por una nueva. Finalmente la polimerización se realizó protegiendo las muestras de la luz, durante 24 horas a 60°C tras transferir las muestras a tubos Eppendorf[®].

10.6. Obtención de cortes ultrafinos de muestras incluidas en resina acrílica LR-WhiteTM.

Las muestras polimerizadas se cortaron en un ultramicrotomo Ultracut EM-UC6 (Leica) y cuchilla de diamante (Diatome Ltd.). Los cortes fueron recogidos un Perfect Loop (Diatome Ltd.), previamente sonicado durante 5 min en etanol, y se depositaron sobre rejillas especiales para seriados de oro o cobre (TAAB) de 200-300 mesh cubiertas con formvar-carbón al 0,25%. Se recogieron cortes semifinos (200-300 nm de grosor) y después cortes ultrafino (70-90 nm de grosor).

10.6.1. Inmunomarcaje de secciones de células incluidas en resina LR-WhiteTM.

Los cortes ultrafinos se depositaron en rejillas de 200-300 mesh con formvar-carbón al 0,25%. Se bloquearon los grupos aldehídos libres mediante incubación con cloruro amónico (NH₄Cl) 0,2 M durante 5 min seguido de 3 lavados en PBSx1 de 5 min cada uno.

Los anticuerpos primarios monoclonales anti-β-actina, anti-cortactina, anti-vimentina, anti-vinculina (a una dilución de 1:100), los anticuerpos primarios policlonales anti-dinamina y anti-mitofusina (a una dilución de 1:50), y el anticuerpo policlonal contra la proteína de la nucleocápsia del VBUN anti-N-947 (a una dilución 1:200), se diluyeron en el tampón TBG. La incubación se mantuvo durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 lavados en TBG-PBSx1 de 5 min. Los anticuerpos secundarios unidos a oro coloidal (de 5, 10 ó 15 nm de diámetro) fueron diluidos con tampón TBG y las muestras se incubaron durante 1 hora (1:100). Finalmente, se terminó con una serie de lavados TBG-PBSx1 y agua destilada. Durante 30 min se dejaron secar las rejillas a temperatura ambiente. Después, se tiñeron con acetato de uranilo saturado durante 20 min y con citrato de plomo durante 2-3 min (entre ambos pasos y al final de la tinción se hicieron lavados con agua destilada). Las rejillas se secaron durante 20-30 min a temperatura ambiente.

10.7. Preparación de rejillas para microscopía electrónica.

Las rejillas utilizadas para los cortes seriados y ultrafinos fueron las rejillas de cobre 50-GP (TAAB). Las rejillas utilizadas para inmunomarcajes fueron de 200 y 300 mesh de cobre y oro (TAAB). Las rejillas de 50 GP presentaron una fina capa de formvar (TAAB) al 0,75%, mientras que las rejillas de 200 y 300 mesh se recubrieron con formvar-carbón al 0,25%.

11. Reconstrucción 3D de cortes seriados.

Los cortes ultrafinos para las series se obtuvieron en un ultramicrotomo Ultracut EM-UC6 (Leica). La recogida de los mismos se realizó empleando un Perfect Loop (Diatome Ltd.) depositándolos en rejillas de cobre de barras paralelas de 50 GP (TAAB) recubiertas por formvar al 0,75%, anotando el orden de los mismos, para su posterior estudio por microscopía electrónica (Fontana y cols., 2007, 2008). Tras la tinción habitual en acetato de uranilo y citrato de plomo, en el microscopio electrónico se seleccionaron zonas de interés y se tomaron micrografías de la zona seleccionada en varios planos consecutivos, aproximadamente entre 6-10 cortes seguidos, reconstruyendo un volumen aproximado de 0,5-0,7 μm . Para determinar la zona a reconstruir, se buscaron estructuras membranosas en los cortes centrales de la serie, para a continuación, fotografiar la misma zona en todos los cortes. Una vez fotografiada la zona de interés, se escanearon los negativos en un escáner Perfection 3170 PHOTO (EPSON) a 600 píxeles por pulgada. Posteriormente, las imágenes se normalizaron a una media de niveles de grises de 128, con una desviación estándar igual a la media de las desviaciones estándar de las imágenes de la serie, empleando el programa Bsoft (<http://www.niams.nih.gov/rcn/labbranch/lsbr/software/bsoft/bsoft.html>; Heymann y Belnap, 2007).

A continuación, se alinearon las imágenes empleando el programa Reconstruct (<http://synapses.bu.edu/tools/index.htm>; Fiala, 2005). Para la reconstrucción de los elementos y contactos de interés, se dibujó una máscara para asignar identidad a cada elemento en todas de las micrografías a estudiar utilizando el programa Amira (TGS Europe, Merignac, Francia). La máscara se trata de la región seleccionada a simple vista, siendo un conjunto de píxeles que componen el elemento a estudiar. Este proceso se realiza a mano, es decir, depende del observador la asignación de la máscara a una región o a otra por lo que inevitablemente seleccionaremos píxeles de los alrededores. Para realizar dicha segmentación, contamos con conocimientos previos de las estructuras membranosas obtenidos a partir de las imágenes 2D de las imágenes del MET, asignando identidades sólo en el caso en el que fuesen claramente identificables. El tamaño del voxel obtenido mediante esta técnica tiene una resolución anisotrópica (es decir, una resolución diferente en los diferentes ejes) de aproximadamente 4 nm en los ejes X-Y y 50 nm en el eje Z. Posteriormente, se realizó una reducción del ruido de la micrografía aplicando tres veces el filtro mediana (van der Heide y cols., 2007) y se calculó la cantidad del material previamente seleccionado a mostrar en el volumen 3D, empleando un algoritmo previamente implementado, basado en la suposición de que las distribuciones de la señal y el ruido siguen una curva gaussiana, y determina el punto que mejor las separa (Cyrklaff y cols., 2005).

12. Obtención de virus intracelulares procedentes de células HEp-2.

Se crecieron células HEp-2 sobre placas p-6 (Falcon) y se infectaron a una multiplicidad de infección de 1 UFP/célula durante 24 horas. Se hicieron dos lavados con medio de cultivo DMEM para eliminar restos celulares. Para levantar las células se trataron con Tripsina-EDTA 0,1 M (Tripsina al 0,25% y EDTA al 0,02%) durante 5 min a 37°C y se rasparon para levantarlas. Las células se recogieron en tubo Eppendorf® con 600 µL de medio de cultivo suplementado con FBS al 20%. Se volvió a lavar la placa para recoger las células que pudieran quedar adheridas con ayuda de 600 µL de medio de cultivo. Los sobrenadantes se congelaron a -80°C. Después de varias horas de congelación, los tubos se pasaron a un baño de agua caliente de 37°C y se añadió un cuarto de pastilla de inhibidor de proteasas. Se repitió el proceso de congelación a -80°C durante varias horas, tras las cuales rápidamente se descongelaron otra vez en el baño de 37°C. Después, los sobrenadantes se sonicaron en pulsos de 20 segundos durante 2 min a 4°C. La suspensión celular y viral se centrifugó durante 8 min a 2000 rpm a 4°C. Se recogieron los sobrenadantes con los virus intracelulares y se almacenaron a -80°C.

13. Desarrollo de protocolos de microscopía correlativa.

Las técnicas de microscopía correlativa permiten visualizar las mismas estructuras a distintas escalas de magnificación, combinando diferentes marcadores y los distintos niveles de resolución óptica y electrónica (Darcy y cols., 2006, McRae y cols., 2006 Takizawa y Robinson, 2003; Robinson y cols., 2000; Velasco e Hidalgo, 1987). Las imágenes obtenidas permiten obtener una información morfológica adicional, lo que proporciona una caracterización muy completa y específica sobre las estructuras de interés al llevarse a análisis estructural los elementos identificados como interesantes en la célula viva (Takizawa y Robinson, 2003). Sin embargo, muchos de los procedimientos que forman parte de estas técnicas son arduos y requieren ciertas habilidades del propio investigador (van Driel y cols., 2008). Los campos de estudio en microscopía óptica son de aproximadamente 50x50 µm con una resolución de 200 nm permitiendo seleccionar zonas de interés, mientras que en microscopía electrónica estas áreas son de 4x4 µm en resolución de 0,2 nm (Koster y Klumperman, 2003) proporcionando información ultraestructural detallada del área previamente escogida.

En pequeños fragmentos de Thermanox® (Nunc) Plastic Coverslips de aproximadamente 10,5x22 mm, se realizaron pequeñas cuadrículas dibujadas a mano con ayuda de un bisturí para marcar el plástico. Los trozos fueron pegados en placas p-6 (Falcon) con ayuda de laca de uñas transparente MaxFactor y bajo la luz ultravioleta toda la noche. Se cultivaron las células sobre los trocitos de Thermanox® y se infectaron con VBUN a 1 UFP/célula durante 10 hpi. Se fijaron las células con el medio de cultivo usando PFA al 4 % durante 20 min a temperatura ambiente y se realizaron tres lavados con PBSx1. Se seleccionaron las células de interés gracias a la cuadrícula previamente dibujada. Seguidamente, se hicieron tres lavados en HEPES 0,4 M, pH 7,2 para eliminar restos de PBSx1. A continuación las muestras se fijaron con una mezcla de glutaraldehído al 1% y ácido tánico al 0,5% en HEPES durante varias horas a temperatura ambiente. Se hicieron 3 lavados con HEPES y se continuó con el protocolo general de inclusión de monocapas en epoxi-resina: primeramente la fijación de lípidos con tretóxido de osmio al 1% y ferricianuro potásico al 0,8% durante 1 hora a 4°C (ver apartado de Materiales y métodos “10.1. Inclusión epoxi-

resina EML-812”). Después de 60 horas de polimerización, las regiones de interés fueron encontradas por las letras y números dibujados en el Thermanox[®]. Se realizaron secciones ultrafinas de las zonas seleccionadas y se siguió el protocolo general de tinción para muestras estudiadas en microscopía electrónica de transmisión.

En placas p-36 MatTek[®] Corporation Glass Bottom Cultured Dished (P35G-2-14-CGRD) con cuadrícula marcada en el cristal, se crecieron células HEp-2 para ser infectadas con el virus quimera VBUN-GFP-NSm (Shi y cols., 2006). Este virus quimera lleva insertado entre los residuos 403-420 del segmento M, la proteína verde fluorescente permitiendo saber qué células se están infectando a tiempo real. A las 24 hpi se seleccionaron, gracias a la cuadrícula y a la fluorescencia, las células HEp-2 infectadas en el microscopio de fluorescencia para ser estudiadas después por microscopía electrónica. Se fijaron las células siguiendo el protocolo descrito en el apartado “10.6 Obtención de cortes ultrafinos de muestras incluidas en la resina LR-White[™]”. Tras la polimerización de las muestras, se separó el cristal de las placas p-36 MatTek[®] de la resina LR-White[™] con golpes calor-frío usando nitrógeno líquido a -196°C y agua tibia.

Las células seleccionadas fueron localizadas en la resina de por las marcas dejadas por la cuadrícula de la placa. Una vez localizada la zona de interés, se cortó la muestra y se obtuvieron secciones ultrafinas en el Ultramicrotomo EM-UC6 (Leica). Las muestras se tiñeron con acetato de uranilo saturado durante 20 min, y con citrato de plomo durante 2-3 min siguiendo el protocolo habitual. Finalmente, las rejillas fueron estudiadas en un microscopio electrónico modelo JEM 1011(JEOL) que opera a 100Kv.

14. Análisis Bioquímicos.

14.1. Western-blot.

Para estudiar los posibles cambios de expresión de proteínas del citoesqueleto y relacionadas con procesos de adhesión celular, se realizaron estudios de Western-blot después de la electroforesis de geles al 12% de poliacrilamida en presencia de SDS, utilizando extractos de células control e infectadas. Se crecieron células en placas p-6 (Falcon) hasta obtener la máxima confluencia. Se eliminó el medio de cultivo y se hicieron dos lavados para eliminar restos celulares con medio de cultivo. Las células se recogieron en 150 µL en tampón Laemmli 5x con β-mercaptoetanol (50 µL de mercaptoetanol por 950 µL de tampón Laemmli).

La desnaturalización total de las muestras se realizó calentando en un termobloque durante 5 min a 95°C, seguido de centrifugación a 14000 rpm durante 5 min para la homogenización de la muestra. Se cargaron 20µl/pocillo y se corrió el gel 10 min a 70 mV y 1 hora a 60 mV (con amperaje constante de 20 mA). Para transferir las proteínas separadas por PAGE-SDS se usó un tampón de transferencia. La membrana de nitrocelulosa se humedeció con este tampón así como las esponjas de transferencia. La transferencia se realizó durante 45 min a 15 mV. La membrana de nitrocelulosa se tiñó durante dos min con una dilución de rojo Ponceau para observar las bandas transferidas. El gel de poliacrilamida se tiñó durante 2 horas en leve agitación en una dilución de azul Coomassie para comprobar la cantidad de proteína no transferida. Después de realizar la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se dejó en tampón de bloqueo a 4°C durante toda la noche.

A la mañana siguiente se realizaron las incubaciones con los anticuerpos primario y secundario, y finalmente, el revelado de la membrana. Durante aproximadamente 2 horas, se incubó la membrana con el anticuerpo primario en tampón de bloqueo en leve agitación. Después, se realizaron tres lavados de 10 min en tampón de bloqueo. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario en tampón de bloqueo durante 1 hora y también con leve agitación. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 min en tampón de bloqueo. Finalmente el revelado se realizó usando películas fotosensibles (Kodak) y la solución fotosensible ECL plus Western Blotting System de Amshermam Bioscience.

Algunas muestras se obtuvieron mediante lisado en tampón RIPA a 4 °C y eliminación de los núcleos. Las células crecidas en placas p-6 (Falcon) a máxima confluencia se levantaron con Tripsina-EDTA (Tripsina 0,25% y EDTA 0,02%) durante 5-10 min a 37°C. Para inactivar la Tripsina se recogieron las células con PBSx1. El tampón RIPA debe estar a 4°C cuando se añade ¼ de pastilla de inhibidor de proteasas (2,5 mg de inhibidor/ 500 µL de RIPA). Las células son centrifugadas durante 5 min a 1200 rpm en PBSx1. Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado celular es resuspendido en 100 µL de tampón RIPA y mantenido 20 min a 4°C. Se debe comprobar al microscopio óptico que las células se han lisado al detectarse los núcleos celulares usando una pequeña alícuota de 10 µL usando la cámara de Neubauer. Transcurridos los 20 min a 4°C, se centrifugó en la microfuga durante 20 min a 13000 rpm y a 4°C. Se recogió el sobrenadante (región citoplasmática) y se desecharon los precipitados (núcleos celulares). El sobrenadante fue almacenado a -80°. Se añadió 5 µL de tampón Laemmli 5x por cada 10 µl de muestra antes de realizar la electroforesis (SDS-PAGE, en gel de poliacrilamida al 12%).

15. Ensayo de adhesividad.

Se crecieron células BHK-21, MRC-5 y HEp-2 en placas M-24 (Falcon) hasta alcanzar una confluencia del 80%. Se infectaron a 1 UFP/célula en células BHK-21 y HEp-2 durante 16 y 24 horas. Se infectaron células MRC-5 con 1 UFF/célula durante 16 horas. Se realizaron recuentos en células control e infectadas antes de añadir Tripsina-EDTA, 0,1 M en PBSx1. Se retiró el medio de cultivo en células control e infectadas y se incubaron a 37°C con Tripsina-EDTA, PBSx1 durante 1, 2 y 5 min. Se repitieron los recuentos de las células que permanecían adheridas a la placa utilizando el microscopio invertido de contraste de fases Zeiss.

Resultados

1. Resultados en células de hámster BHK-21 infectadas por el VBUN.

1.1. Caracterización de estructuras membranosas inducidas por la infección.

1.1.1. Formación de la factoría viral *in vivo*.

Para estudiar los cambios morfológicos a tiempo real asociados a la formación de la factoría viral del VBUN, se estudió la infección en células BHK-21 a tiempo real. Para ello, se quiso comprobar a qué tiempos se producía el reclutamiento de mitocondrias a regiones perinucleares durante la formación de la factoría viral. Se utilizó la sonda Mitotracker[®] para detectar las mitocondrias que fue añadida a células vivas control e infectadas a 5 UFP/célula. Se fijaron 15 posiciones de células control y 18 posiciones de células infectadas. En cada posición se detectaron 20-30 células. En total se estudiaron aproximadamente 300 células BHK-21 control y 540 células BHK-21 infectadas. Cada 15 min se tomó una imagen en el microscopio TCS-SP-5 (Leica) hasta las 18 horas. En las células control, las mitocondrias se detectaron distribuidas homogéneamente por todo el citoplasma (Figuras R-1-A y R-1-B).

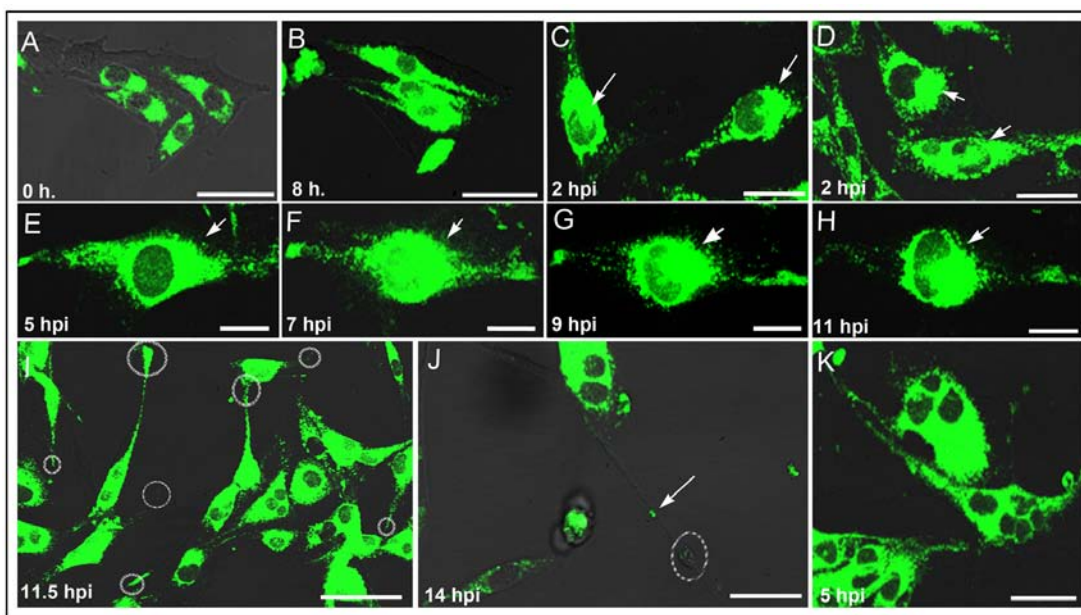


Figura R-1. Estudio *in vivo* de la formación de la factoría viral. Mitotracker[®] (verde). (A) y (B) Células BHK-21 control. Desde (C) hasta (K) células BHK-21 infectadas. En (C) y (D) se muestra reclutamiento perinuclear de la señal de Mitotracker[®] a 2 hpi. En (E) hasta (H) Reclutamiento de la señal de mitocondrias y desplazamiento de la factoría viral. En (I) formación de prolongaciones celulares (círculos) a 11,5 hpi. En (J) a 14 hpi, se muestra una prolongación que acaba en una pequeña protuberancia; la flecha blanca indica señal de Mitotracker[®] dentro de la prolongación. (K) Células BHK-21 multinucleadas a 5 hpi. Barras en (A) y en (B) 20 µm. Desde (C) hasta (H) 30 µm, en (I) 75 µm y en (J) y en (K) 40 µm.

En las células BHK-21 infectadas con el VBUN, se detectó reclutamiento perinuclear de la señal de mitocondrias a partir de 2 horas de infección (Figuras R-1-C y R-1-D). La señal de fluorescencia del grupo de mitocondrias se desplazó con el tiempo, como mostró la señal de Mitotracker[®] (Figuras R-1-E hasta R-1-H). Las células infectadas se movieron más que las células sin infectar, emitiendo largas prolongaciones que conectan células entre sí (en ocasiones desprendiéndose de la

prolongación durante el movimiento celular), (Figuras R-1-I y R-1-J). La señal de Mitotracker[®] también fue detectada en el interior de finas prolongaciones (Figura R-1-J). A partir de 5 hpi, se observan numerosas células con 2 y 3 núcleos, lo que sugiere que la infección del VBUN provoca un bloqueo en la división celular (Figura R-1-K).

El estudio *in vivo* de la formación de la factoría viral reveló que el reclutamiento de las mitocondrias ocurre a tiempos tempranos de la infección viral, entre 2-3 hpi. La señal de Mitotracker[®] se intensificó en regiones yuxtannucleares y se movió significativamente con el tiempo. La morfología de la célula infectada se modificó, se formaron largas prolongaciones celulares y se incrementó la movilidad celular. Estos estudios de vídeo-microscopía permitieron seleccionar los tiempos de post-infección interesantes para el análisis estructural.

1.1.2. Inclusión en epoxi-resina EML-812.

- Cortes paralelos a la base celular

Los cortes de regiones basales de células control e infectadas se realizaron utilizando monocapas orientadas. Las estructuras membranosas más complejas y numerosas se detectaron en células BHK-21 infectadas (Figura R-2). Se midió el espaciado entre las lamelas de diez estructuras membranosas y se obtuvieron distancias desde 10 nm (Figura R-2-A) hasta 18 nm, aproximadamente (Figuras R-2-B R-2-C, R-2-D y R-2-E). Estas medidas de espaciado entre las lamelas de las estructuras membranosas, son similares a las terminaciones finales de las espátulas de los pies del *Tockay gecko*, es decir, 10 nm (Kim y Bhusan, 2007).

El grado de vacuolización y vesículas intracelulares en células infectadas también fue superior que en células control.

Todas las estructuras membranosas se detectaron en regiones basales, algunas sin conexión aparente con la célula (Figura R-2-C), en extremos celulares (Figura R-2-D) o con una estrecha conexión a la célula (Figura R-2-E). En células control las escasas estructuras membranosas observadas fueron menos complejas y de menor tamaño y en ningún caso sobrepasaron una altura de 0,5 μ m desde la base celular (Figura R-2-G).

Tanto en células BHK-21 control como en infectadas, el diseño estructural de las estructuras membranosas fue similar, lamelas apiladas entre sí, en las que la membrana plasmática conecta con la lamela más externa de las estructuras. Durante la infección, se incrementó considerablemente la complejidad y el número de estructuras membranosas por célula.

- Cortes perpendiculares a la base celular.

Se realizaron cortes perpendiculares a la base celular en células BHK-21 control e infectadas para favorecer la visualización de las estructuras membranosas en las regiones basales. Fueron escasas las estructuras membranosas encontradas en células BHK-21 control. En células BHK-21 infectadas, se observaron complejas estructuras en contacto con la superficie del sustrato, sobre el cual se crecieron las células (Figuras R-3).

Las estructuras membranosas mostraron por multilamelas membranosas apiladas. Se estudió el espaciamiento entre 10 lamelas contiguas de estructura

membranosas de la Figura R-3, obteniéndose un valor medio de 34,76 nm \pm 17,68 nm. También se tomaron 10 puntos para calcular la longitud desde la base del Thermanox[®] de la misma estructura membranosa, detectándose una distancia media de 627,98 nm \pm 126,38 nm. Este valor es similar a la longitud de las terminaciones finales de las setas de los geos (aproximadamente 500 nm), (Kim y Bhusan, 2007). No se observó una conexión directa con ningún orgánulo celular, pero sí con la membrana plasmática.

La orientación de los cortes perpendiculares permitió observar que las estructuras membranosas constituidas por lamelas membranosas se encontraron en regiones basales en contacto directo con la base del sustrato celular sin conexión directa a ningún orgánulo celular, a excepción de la membrana plasmática.

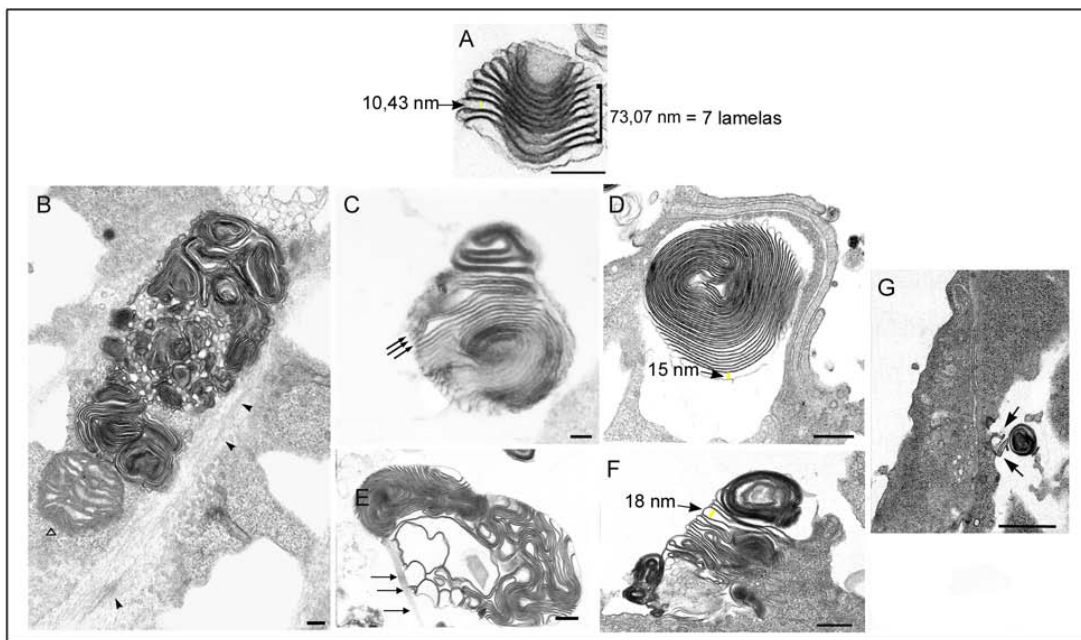


Figura R-2. Micrografías electrónicas de estructuras membranosas multilamelares en células BHK-21 infectadas a 10 hpi (1 UFP/célula) con el VBUN. Desde (A) hasta (F), micrografías de estructuras membranosas procedentes de células BHK-21 infectadas con VBUN a 10 hpi. (A) Estructura membranosa en regiones basales de células BHK-21, el espaciado entre lamelas es aproximadamente de 10 nm; el espaciamiento en 7 lamelas fue de 73,07 μ m. (B). Estructura membranosa a 0,21 μ m de altura desde la base celular; la punta de flecha blanca señala una sección de una mitocondria próxima a la estructura, las puntas de flechas negras muestran filamentos del citoesqueleto. (C) Estructura a 0,5 μ m de altura desde la base celular. Las flechas indican el espaciado entre las membranas que forman parte de la estructura. (D) y (E) Estructuras membranosas a 0,8 μ m de altura desde la base celular. En (D) la flecha indica el espaciamiento final de las últimas lamelas de la estructura, 15 nm. Las flechas en (E) indican conexión con la célula. (F) Estructura aproximadamente a 1 μ m de altura desde la base celular; la flecha indica el valor del espaciamiento entre lamelas, 18 nm. (G) Estructura membranosa a 0,5 μ m de altura desde la base celular de una célula BHK-21 control, las flechas negras indican conexión con la membrana plasmática. Barra en (A) 50 nm, en (B) 2 μ m, en (C), (D), (E) y (F) 100 nm y en (G) 1 μ m.

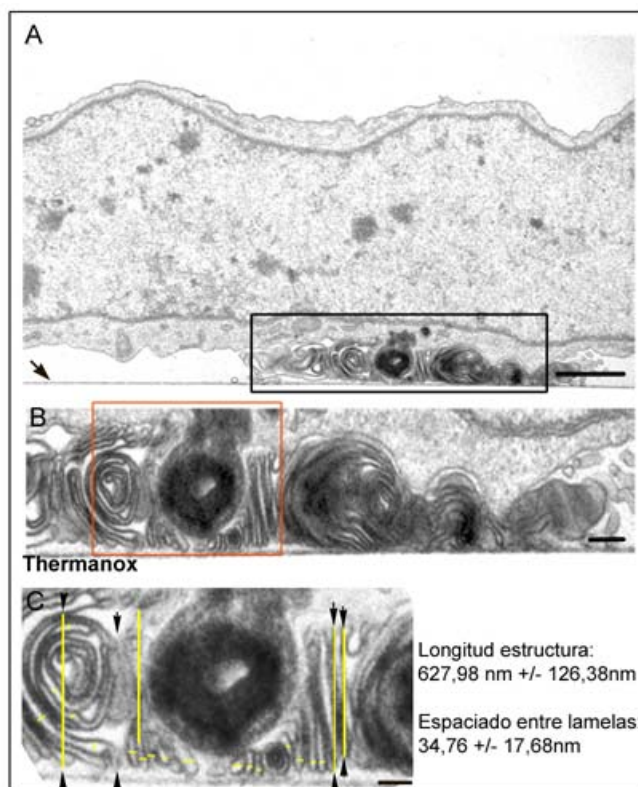


Figura R-3. Micrografías electrónicas de estructuras membranasosas procedentes de cortes perpendiculares a la base celular de una célula BHK-21 infectada a 10 hpi (1 UFP/célula). (A) Estructura membranosa compleja (recuadro) en contacto con la superficie del Thermanox[®] (flecha negra). (B) Detalle de (A) a mayor magnificación, el rectángulo naranja señala la región de la estructura membranosa seleccionada para medir la distancia entre lamelas y la distancia hasta el Thermanox[®]. (C) Detalle ampliado de (B) en el que se muestra la longitud de la estructura membranosa hasta el contacto con el Thermanox[®] y el espaciado entre las lamelas. Barra en (A) 1 μ m, en (B) 200 nm y en (C) 50 nm.

1.1.3. Cortes seriados de estructuras membranasosas de células BHK-21 infectadas e incluidas en Epoxi-resina EML-812.

El estudio de los cortes seriados reveló conexiones entre las estructuras membranasosas con la membrana plasmática (Figuras R-4-A, R-4-A1 y R-4-A2). Desde los cortes basales hasta los apicales, la complejidad y la cantidad de lamelas membranasosas que formaron parte de las estructuras, fue descendiendo. La lamela más externa de la estructura conectó directamente con la membrana plasmática (Figuras R-4-B hasta R-4-B3 y Figuras R-4-C hasta R-4-C2).

Se han observado que estructuras membranasosas sin aparente conexión con la célula en regiones basales, sí conectaron con la célula a través de la membrana plasmática en planos más apicales. El estudio detallado de los cortes seriados demostró que las estructuras membranasosas aparecieron en planos basales hasta aproximadamente 1 μ m de altura desde la base celular. Fue necesario el estudio plano a plano para la detección de conexiones con la membrana plasmática.

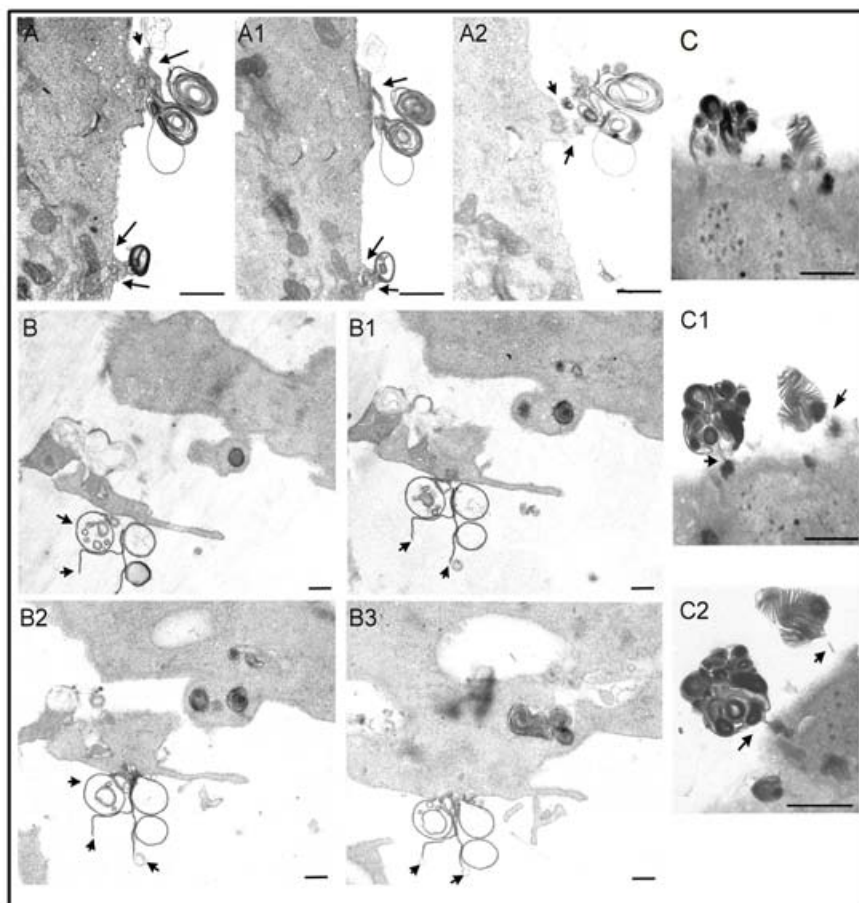


Figura R-4. Micrografías electrónicas pertenecientes a cortes seriados de estructuras membranosas procedentes de células BHK-21 infectadas a 10 hpi (1 UFP/célula). Secciones de 75 nm de grosor. Desde (A) hasta (A2), cortes desde 0 a 0,41 μm de altura desde la base celular. Las flechas indican conexión con la membrana plasmática. Desde (B) hasta (B3), cortes desde 1,3 μm hasta 3 μm de altura desde la base celular, las flechas indican la última lamela membranosa que forma parte de la estructura. (C, C1 y C2) Cortes a 0-0,84 μm de altura desde la base celular en la que se detectaron dos estructuras membranosas con conexión a la membrana plasmática a través de una fina prolongación celular. Barras en (A) hasta (A2) 1 μm , en (B) hasta (B3) 500 nm y en (C) hasta (C2) 2 μm .

1.1.4. Reconstrucción tridimensional de cortes seriados de estructuras membranosas multilamelares.

La reconstrucción tridimensional de las estructuras membranosas se centró en el estudio detallado de cortes seriados y de posibles conexiones con orgánulos celulares. El modelo tridimensional generado volvió a demostrar la organización multilamelar de las estructuras membranosas, sin contacto directo con orgánulos celulares. Sólo se observaron sáculos dispersos de RER y mitocondrias en regiones próximas de la membrana plasmática de las células que presentaron estructuras membranosas. Sin embargo, sí se detectó la continuidad entre la lamela membranosa más externa de la estructura y la membrana plasmática, como se aprecia en determinados cortes de microscopía electrónica, mostrados en las Figuras R-5-A, R-5-B y R-5-C. La reconstrucción tridimensional (Figura R-5-F) muestra una estructura membranosa formada por lamelas individuales conectada con la membrana plasmática a través de las lamelas membranosas más exteriores. Las estructuras

membranosas tienen, por tanto, su origen en la membrana plasmática, mientras que las endomembranas celulares no están implicadas en su formación.

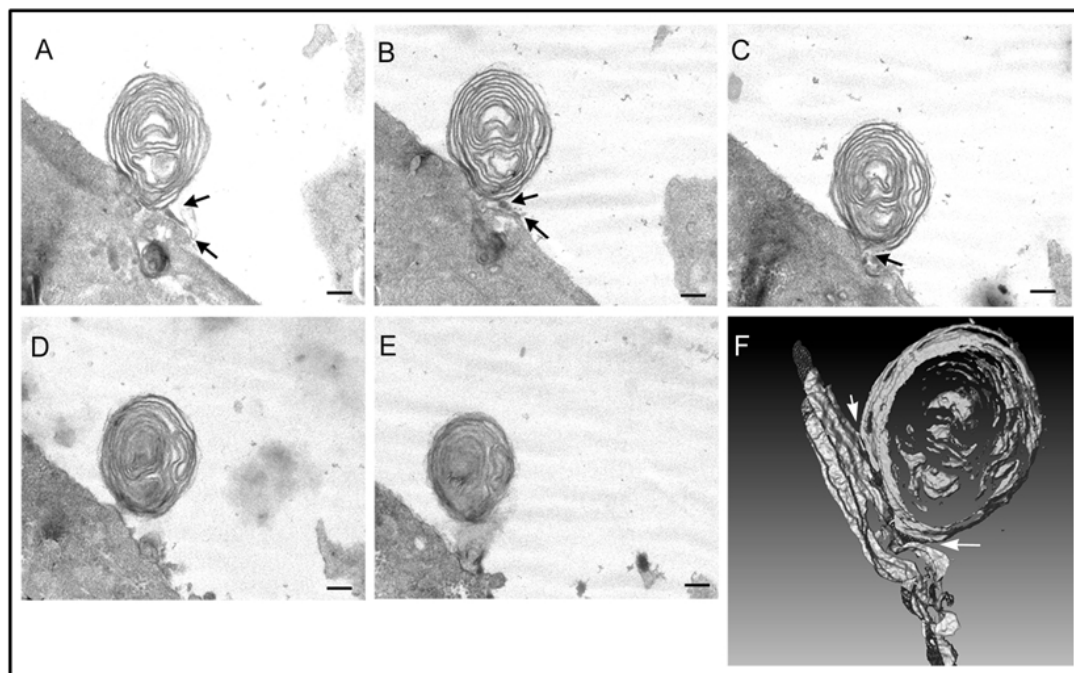


Figura R-5. Obtención de un modelo tridimensional de estructura membranosa mediante 5 cortes seriados de 70 nm de grosor en células BHK-21 infectadas a 10 hpi (1 UFP/célula). Desde (A) hasta a (E), cortes seriados de una estructura membranosa. (A) A 0,250 μm de altura desde la base celular. (B) A 0,320 μm de altura desde la base celular. (C) A 0,390 μm de altura desde la base celular. (D) A 0,460 μm de altura desde la base celular. (E) A 0,530 μm de altura desde la base celular. Las flechas negras en (A), (B) y (C) indican puntos de unión con la membrana plasmática y la estructura membranosa. (F) Modelo tridimensional generado con el estudio de los cortes desde (A) hasta (E) incluidos. Barra desde (A) hasta (E), 200 nm.

1.2. Caracterización de las estructuras membranosas a través de técnicas de microscopía óptica de fluorescencia.

1.2.1. Marcador de membrana plasmática FM[®]1-43FX y WGA.

Las estructuras visualizadas en MET presentaron tamaños de varias micras de longitud y hasta 1 μm de altura en el eje Z. Los cortes seriados y orientados permitieron observar la continuidad de las lamelas más externas de las estructuras con la membrana plasmática. Para estudiar su localización en células completas, se usaron marcadores de membrana plasmática. Se usó la sonda FM[®]1-43FX, que se une rápida y reversiblemente a la membrana plasmática, provocando una intensa fluorescencia verde. La sonda WGA, en ausencia de agentes permeabilizantes, permitió también el marcaje del contorno celular. La señal de FM[®]1-43FX no fue específica de membrana plasmática y marcó también compartimentos membranosos intracelulares. La sonda FM[®]1-43FX marca el contorno celular predominantemente en células nerviosas. Sin embargo, la lectina WGA marca el glicocáliz de un amplio rango de células, al unirse al ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) y a restos de N-acetilglucosamina (Figura R-6-A y R-6-B). En la Figura R-6-B se muestra todo el contorno de la célula, que presentó rugosidades o “blebs” en algunas zonas de la célula sin permeabilizar.

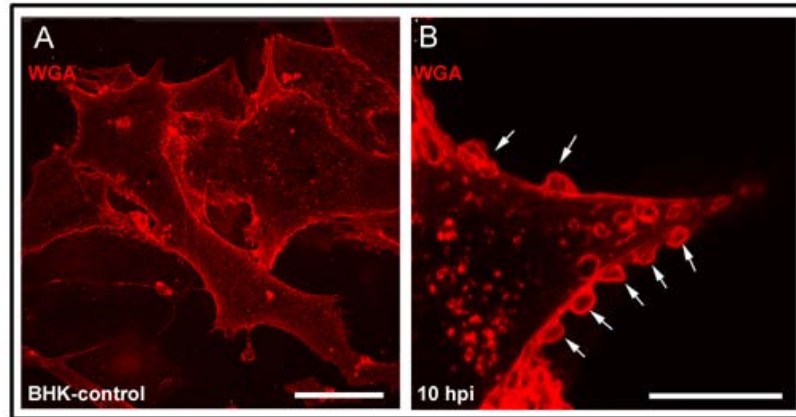


Figura R-6. Estudio por microscopía confocal del contorno celular de las células BHK-21 control e infectadas a 10 hpi (1 UFP/ célula) marcadas con la lectina WGA. WGA 594 (rojo). (A) Células BHK-21 control marcadas con WGA 594 sin permeabilizar. (B) Células BHK-21 infectadas a 10 hpi, marcadas con WGA 594 sin permeabilizar. Las flechas blancas muestran rugosidades de la membrana plasmática situadas en un extremo celular. Barra en (A) 25 μm y en (B) 5 μm .

1.2.2. Comparación de estructuras membranosas encontradas en MET y marcaje del contorno celular usando la sonda WGA sin permeabilizar.

Se encontraron similitudes en las estructuras membranosas marcadas con WGA en células a 10 hpi (1 UFP/célula) y las estructuras membranosas procedentes de cortes ultrafinos de MET (Figura R-7). La intensidad de la fluorescencia de estas estructuras fue mayor que en otras zonas de la membrana plasmática, lo cual sugiere un posible apilamiento de membranas. En la imagen A de la Figura R-7 se midieron las dimensiones de la estructura en los ejes X e Y, siendo 2,83 μm y 3,54 μm , respectivamente. Se calculó el área de la estructura siendo de 8,644 μm^2 . También se midió la distancia entre el borde de la membrana plasmática hasta el final de la estructura, siendo de aproximadamente de 10,08 μm .

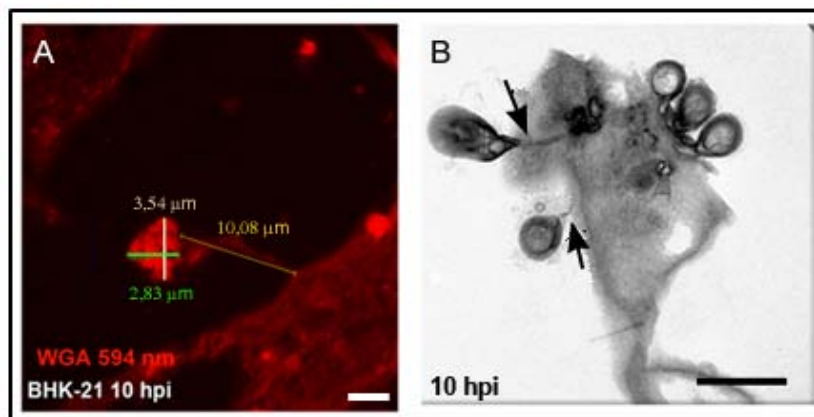


Figura R-7. Comparación de estructuras membranosas observadas en microscopía de fluorescencia y en cortes de MET en células BHK-21 infectadas a 10 hpi (1 UFP/célula). (A) Detalle de estructura marcada con la sonda WGA en una célula BHK-21 infectada 10 horas. Se muestran las dimensiones de la estructura y la distancia de la conexión con la membrana. (B) Micrografía electrónica de un corte de 70 nm grosor de una estructura membranosas detectada en una célula BHK-21 infectada a 10 hpi. Las flechas negras indican la zona de conexión de las estructuras con la célula. Barra en (A) 2 μm y en (B) 100 nm.

1.2.3. Reconstrucción de planos confocales usando el programa “Image J”.

Usando los planos confocales de la estructura mostrada en la figura R-7-A, se realizó una reconstrucción tridimensional con el programa “Image J”. La estructura marcada con la lectina WGA alcanzó una altura de varios cientos de nanómetros (Figuras R-8-A y R-8-B), del mismo modo que en los cortes seriados estudiados por MET. Esto explicaría la aparente falta de conexión de las estructuras con la célula en el estudio de cortes seriados de MET, ya que dicha conexión se produce sólo en alguno de los planos.

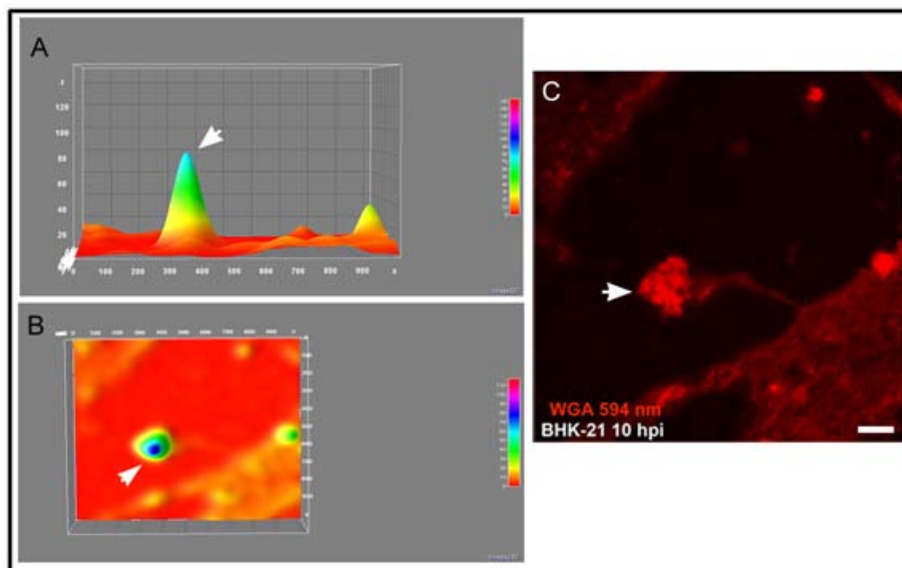


Figura R-8. Reconstrucción tridimensional de una estructura membranosa detectada con la sonda WGA utilizando el programa “Image J” en células BHK-21 infectadas a 10 horas. En (A) y (B) estudio de los ejes X, Y, Z de la reconstrucción tridimensional de los planos de microscopía confocal de la estructura visualizada en la Figura R-7-A. (C) Imagen de fluorescencia de la estructura membranosa marcada con la sonda WGA de la que se obtuvo las reconstrucciones de (A) y (B). Barra en (C) 2 μ m.

1.2.4. Estudio de las estructuras membranosas de células BHK-21 por MET con la lectina WGA *in vivo*.

La ultraestructura celular no se alteró por el tratamiento previo con la lectina WGA en células BHK-21 vivas, sino que favoreció ligeramente el contraste de los orgánulos membranosos (Figura R-9-A) como lisosomas, cuerpos multivesiculares, mitocondrias y membrana plasmática.

Respecto a las estructuras membranosas, se observaron con claridad conexiones entre la lamela membranosa más externa de la estructura y la membrana plasmática (Figura R-9-B, R-9-C y R-9-D). Alrededor de las células también se detectaron filamentos extracelulares, entre los que se pudieron visualizar las nuevas partículas virales (Figura R-9-E).

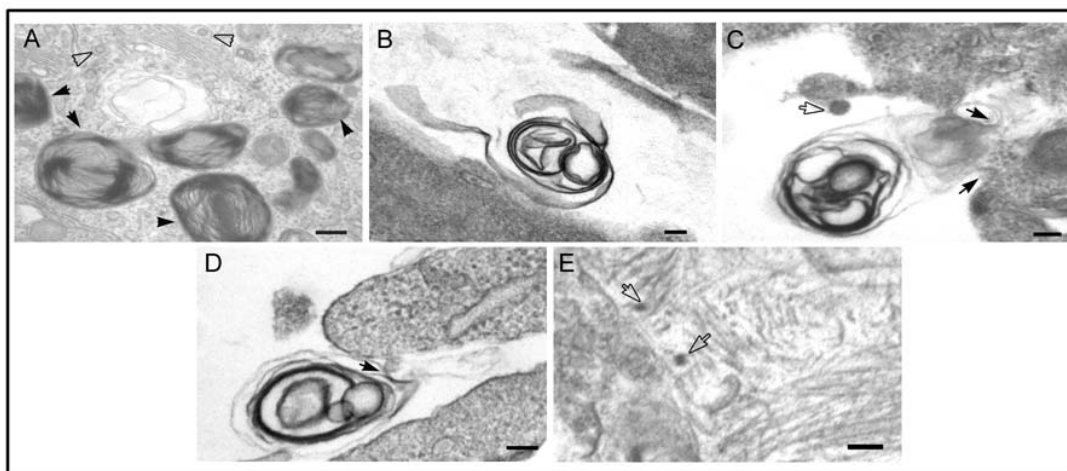


Figura R-9. Micrografías electrónicas de regiones basales de células BHK-21 infectadas a 10 hpi (1 UFP/célula) y tratadas *in vivo* con la sonda WGA. (A) Región del citoplasma de las células BHK-21 infectadas en las que se observan lisosomas altamente contrastados (flechas negras) y virus intracelulares (flechas blancas). Desde (B) hasta (D) estructuras membranosas aproximadamente a 0,6 μm de altura desde la base celular; las flechas negras indican conexión con la membrana plasmática, la flecha blanca en (C) indica un virus extracelular. (E) Zona basal de liberación de virus, las flechas blancas indican dos virus extracelulares. Se observan filamentos extracelulares próximos a los virus. Barras en (A), (B) y (C) 200 nm, y en (D) y (E) 100 nm.

1.2.5. Cuantificación de estructuras membranosas por técnicas de microscopía correlativa y vídeo-microscopía.

Microscopía correlativa.

El estudio de las estructuras membranosas visualizadas por MET y de las posibles estructuras estudiadas por microscopía de fluorescencia, se completó con el desarrollo de protocolos de microscopía correlativa.

Se crecieron células BHK-21 control e infectadas sobre Thermanox[®] marcados con una cuadrícula. Para preservar mejor las estructuras membranosas, se el medio de cultivo no fue retirado durante la fijación de las células. De este modo, permitió una cuantificación más precisa de las estructuras membranosas por célula. Se estudiaron 6 posiciones de fragmentos de Thermanox[®] y en cada posición se estudiaron aproximadamente 4 células. Se hizo un estudio total sobre 24 células BHK-21 infectadas y 24 células BHK-21 control.

Se seleccionaron células con largas prolongaciones similares a las visualizadas en los vídeos de infección de células vivas tratadas con Mitotracker[®] (Figura R-10-A). El estudio de las zonas seleccionadas se facilitó por las letras realizadas en la superficie del Thermanox[®] que quedaron marcadas en la resina tras la polimerización, permitiendo localizar las regiones de interés para su posterior estudio en MET (Figura R-10-B). Se observaron estructuras membranosas próximas entre sí (Figura R-10-C). Se detectaron conexiones directas entre la última lamela de las estructuras membranosas y la membrana plasmática (Figuras R-10-C1 y R-10-D1). Además, se observaron estructuras membranosas en extremos celulares (Figuras R-10-C2 y R-10-D2). También, se observaron estructuras membranosas entre dos células contiguas. En cortes más apicales, a 1,750 y 2,8 μm de altura desde la base celular, se visualizaron estructuras membranosas asociadas a prolongaciones celulares y conectadas con la membrana plasmática. En los cortes más basales, se detectaron filamentos extracelulares, entre los cuales se observaron virus

extracelulares. El estudio de células BHK-21 control no reveló estructuras membranas tan complejas, ni tan numerosas. En las células BHK-21 control se observó ocasionalmente una estructura membranosa por célula. El número de estructuras membranas detectadas en células BHK-21 infectadas fueron de 2-3 estructuras por célula a 16 hpi. Algunas de las estructuras estudiadas alcanzaron más de 500 nm de altura desde la base celular.

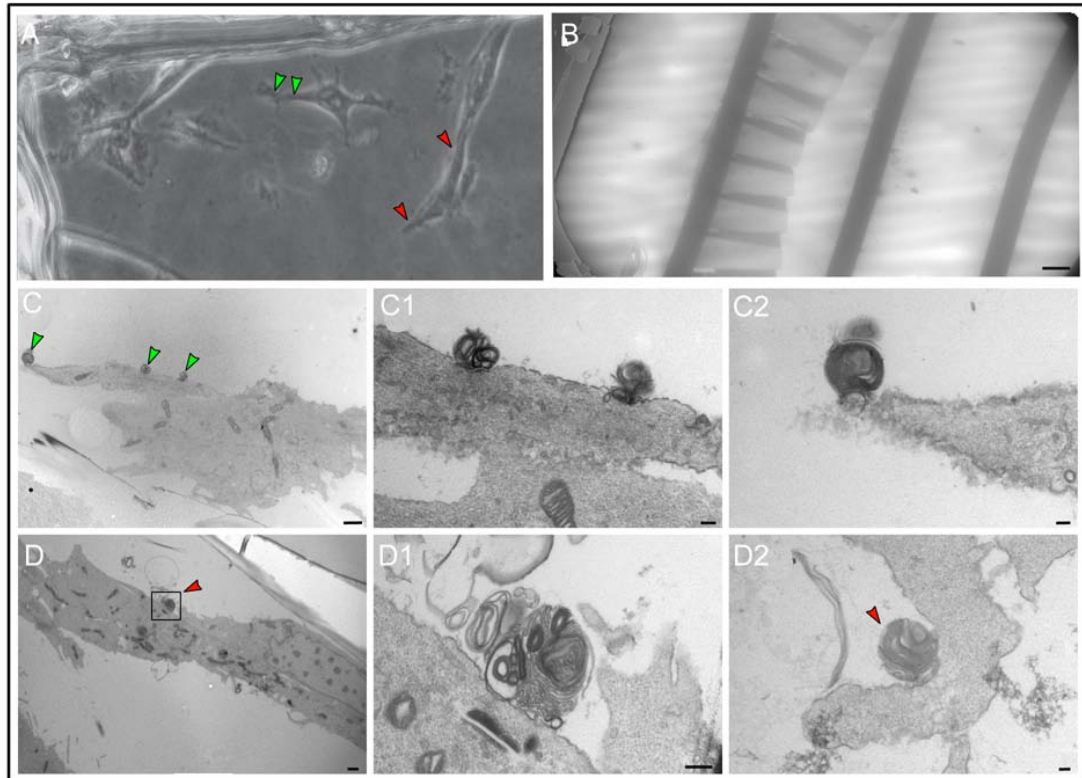


Figura R-10. Estudio por microscopía correlativa de estructuras membranas “gecko-like” en células BHK-21 infectadas a 16 hpi (1 UFP/célula). (A) Selección de células infectadas, las flechas verdes indican la región a estudiar en (C), (C1) y (C2). Las flechas rojas indican la región de la célula para estudiar en (D), (D1) y (D2). (B) Cortes seriados de las células en (A). Secciones ultrafinas de 70 nm de grosor desde (C) hasta (C2) a 0,675 μm de altura desde la base celular. Las flechas verdes indican estructuras membranas estudiadas a mayor magnificación en (C1) y (C2). Secciones ultrafinas de 70 nm de grosor desde (D) hasta (D2) a 1,1 μm de altura desde la base celular. La flecha roja en (D) indica la estructura membranosa seleccionada para ser estudiadas a mayor magnificación en (D1) y (D2). Barra en (B) 100 μm , (C) y (D) 1 μm , en (C1) y (C2) 200 nm y en (D1) y (D2) 100 nm.

Estudio dinámico de la formación de las estructuras membranas usando vídeo-microscopía de célula viva.

Se realizaron tres tipos de ensayos con células vivas BHK-21 y la sonda WGA, con el objetivo de estudiar los cambios en la membrana plasmática que dan lugar a la formación de las estructuras membranas y poder realizar una cuantificación por célula. En cada ensayo, se estudiaron 15 posiciones de células y en cada posición se detectaron aproximadamente 8 células; en total, se estudió el comportamiento de 360 células infectadas y tratadas con la sonda WGA.

En el primer ensayo, se observó la internalización progresiva de la señal de la lectina WGA desde la membrana plasmática a regiones perinucleares. Al añadir de nuevo la sonda WGA al medio de cultivo transcurridas 10 horas, se incrementó la

detección de estructuras conectadas a la membrana plasmática a través de finas prolongaciones celulares (2-3 por célula), coincidiendo con el tiempo de post-infección al que se produce la máxima liberación de nuevos virus (Salanueva y cols., 2003). Transcurridas 18 hpi, se incrementaron las vesículas intracelulares marcadas con la lectina WGA. Los extremos de prolongaciones celulares en ocasiones perdieron conexión directa con la célula (Figuras R-11-A hasta R-11-H). Los extremos de estas prolongaciones fueron similares por tamaño y morfología, a las estructuras membranosas observadas en los cortes de MET y en microscopía correlativa (Figuras R-11-G y R-11-H).

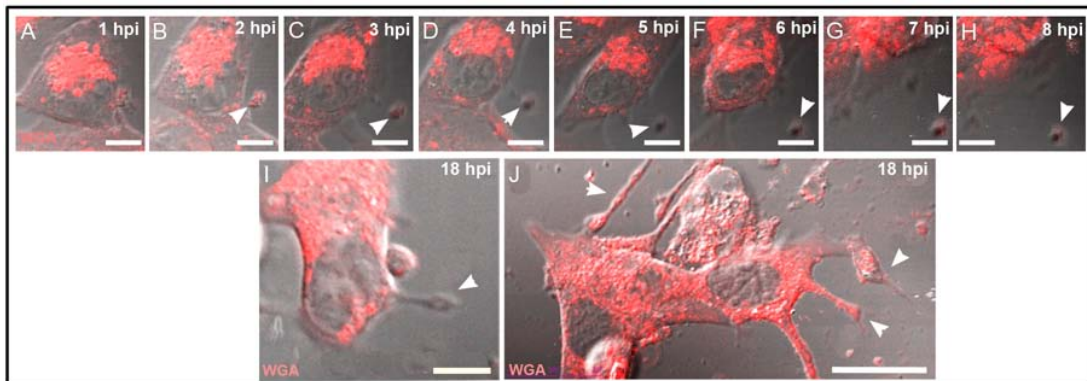


Figura R-11. Vídeo-microscopía de la formación de estructuras conectadas a la membrana plasmática en células BHK-21 infectadas y vivas (1 UFP/célula). WGA 594 (rojo). Desde (A) hasta (H) una célula BHK-21 infectada (1 UFP/célula) en la que se observa la formación de una estructura similar en tamaño y morfología a las estructuras membranosas visualizadas en MET. (A) 1 hpi, (B) 2 hpi, (C) 3 hpi, (D) 4 hpi, (E) 5 hpi, (F) 6 hpi, (G) 7 hpi y (H) 8 hpi. Las puntas de flechas blancas indican una estructura de dimensiones similares a las de las estructuras membranosas observadas en MET. En (C) y (D) además, se observa la conexión entre la membrana plasmática y la estructura similar a las visualizadas por técnicas de MET. La señal de la sonda WGA se intensificó en regiones perinucleares. La membrana plasmática se visualiza mejor a tiempos cortos de infección (1 y 2 hpi). (I) y (J) Células BHK-21 infectadas a 18 hpi y marcadas de nuevo con la sonda WGA; las flechas blancas indican prolongaciones celulares. Barras desde (A) hasta (H) 5 μ m, en (I) 15 μ m y en (J) 25 μ m.

El segundo ensayo, se diluyó la sonda WGA en el inóculo viral. El marcaje de la lectina fue similar al del primer ensayo, concentrándose en zonas perinucleares. A partir de las 10 hpi, las células desarrollaron largas prolongaciones celulares coincidiendo en número con el primer ensayo, 2-3 estructuras por célula. Transcurridas 19 hpi, se volvió a añadir la sonda WGA al cultivo. A las 21 hpi, la mayoría de la monocapa se había desprendido, pero las células que se mantuvieron desarrollaron prolongaciones celulares conectadas a la membrana plasmática que recordaban en dimensiones a las estructuras membranosas (Figuras R-12-A y R-12-B).

En el tercer ensayo, la adición de la sonda WGA se realizó después de la hora de adsorción viral y se hizo un seguimiento durante 10 horas. Las células BHK-21 infectadas, de nuevo, desarrollaron largas prolongaciones, coincidiendo con los anteriores ensayos (2-3 por célula a partir de 10 hpi). Se repitió el marcaje de la lectina, concentrándose principalmente en vesículas en zonas perinucleares durante la infección.

El estudio de la infección viral *in vivo* y el marcaje con la lectina WGA permitió el estudio de la formación de estructuras similares a las visualizadas en MET, conectadas con la membrana plasmática a través de finas prolongaciones. Se

desarrollaron 2-3 estructuras por célula a partir de 10 hpi. Además, se detectó que las células infectadas se movieron más que las células control en los tres ensayos.

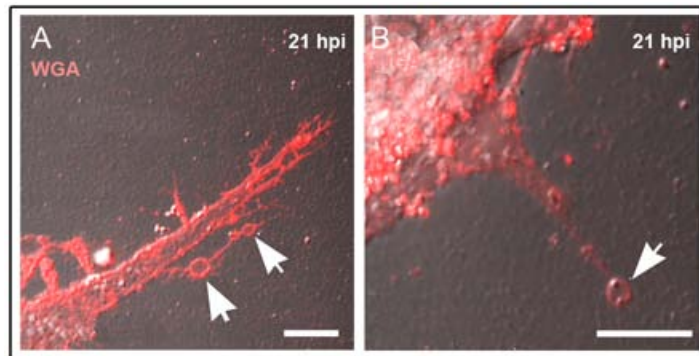


Figura R-12. Formación de estructuras conectadas a la membrana plasmática en células BHK-21 infectadas a 21 hpi (1 UFP/célula) marcadas con la lectina WGA. WGA 594 (rojo). En (A) y (B) se observan finas prolongaciones procedentes de células BHK-21 vivas e infectadas, cuyas terminaciones están marcadas con WGA. Barras 10 μ m.

Los resultados obtenidos por microscopía correlativa y vídeo-microscopía coincidieron en el número de estructuras membranosas desarrolladas por célula (2-3 estructuras) durante la infección del VBUN a las horas estudiadas, 10, 16 y 21 hpi, respectivamente. Por todo ello, se pudo determinar que los extremos de las prolongaciones de las células infectadas visualizadas por vídeo-microscopía terminaban en multilamelas conectadas con la membrana plasmática, formando las estructuras membranosas visualizadas en los cortes de MET (Figura R-13).

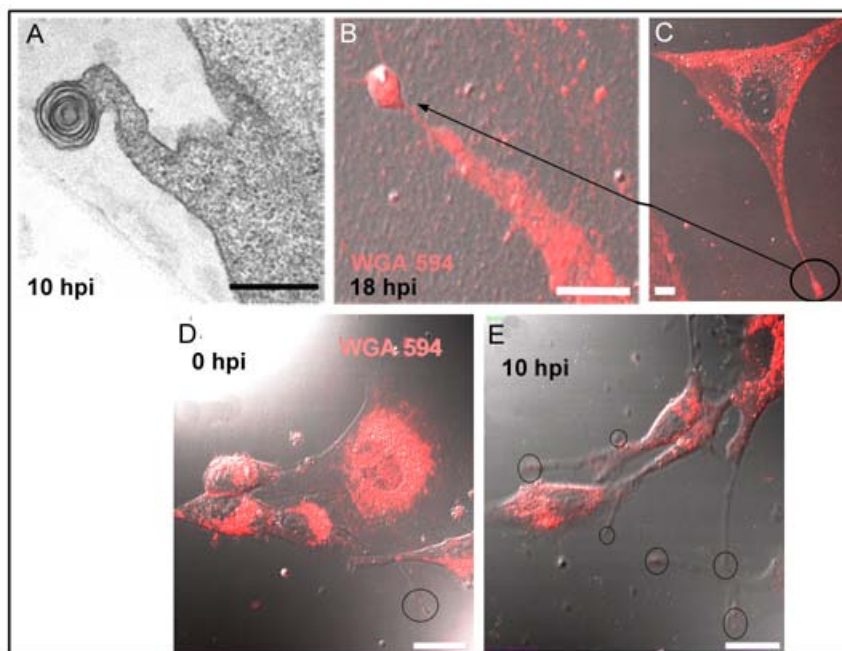


Figura R-13. Formación de prolongaciones celulares durante la infección del VBUN en células BHK-21 infectadas (1 UFP/célula). (A) Micrografía electrónica de un corte ultrafino de 75 nm de grosor de una estructura membranosita situada en un extremo celular a 0,620 μ m de altura de la base celular de una célula BHK-21 infectada a 10 hpi. (B) Estructura visualizada con la sonda WGA en célula BHK-21 viva e infectada a 18 hpi. (C) Célula BHK-21 infectada a 18 hpi. (D) Célula BHK-21 a 0 hpi, el círculo marca una pequeña prolongación. (E) Las mismas células que en (D) infectadas a 10 hpi, los círculos marcan las prolongaciones generadas por célula (2-3). Barra en (A) 200 nm, en (B) y (C) 20 μ m (D) y en (E) 25 μ m.

1.2.6. Participación del citoesqueleto celular en la formación de prolongaciones celulares y en las estructuras membranasas.

La caracterización de las estructuras membranasas por técnicas de inmunofluorescencia se complementó con la búsqueda de proteínas relacionadas en la formación de estas novedosas estructuras. Se estudió el citoesqueleto de actina, vimentina, β -tubulina y la señal del contorno celular marcado con la lectina WGA. En células control, la señal de β -tubulina presentó un patrón filamentoso distribuido homogéneamente por todo el citoplasma. En células BHK-21 control e infectadas, la señal de vimentina, también, fue filamentosa formando finas prolongaciones (Figura R-14-A y R-14-B) y su presencia fue ocasionalmente detectada en el extremo de prolongaciones (Figura R-14-C y R-14-C1). Durante la infección, no se observaron cambios de distribución de β -tubulina que pudieran sugerir relación con la formación de las estructuras membranasas marcadas con la lectina WGA (resultados no mostrados) y la señal de actina marcó predominantemente fibras de estrés en la periferia celular (Figura R-14-B).

Los ensayos por inmunofluorescencia de células BHK-21 infectadas con el VBUN no demostraron la presencia, β -tubulina o actina en las estructuras objeto de estudio marcadas con la sonda WGA.

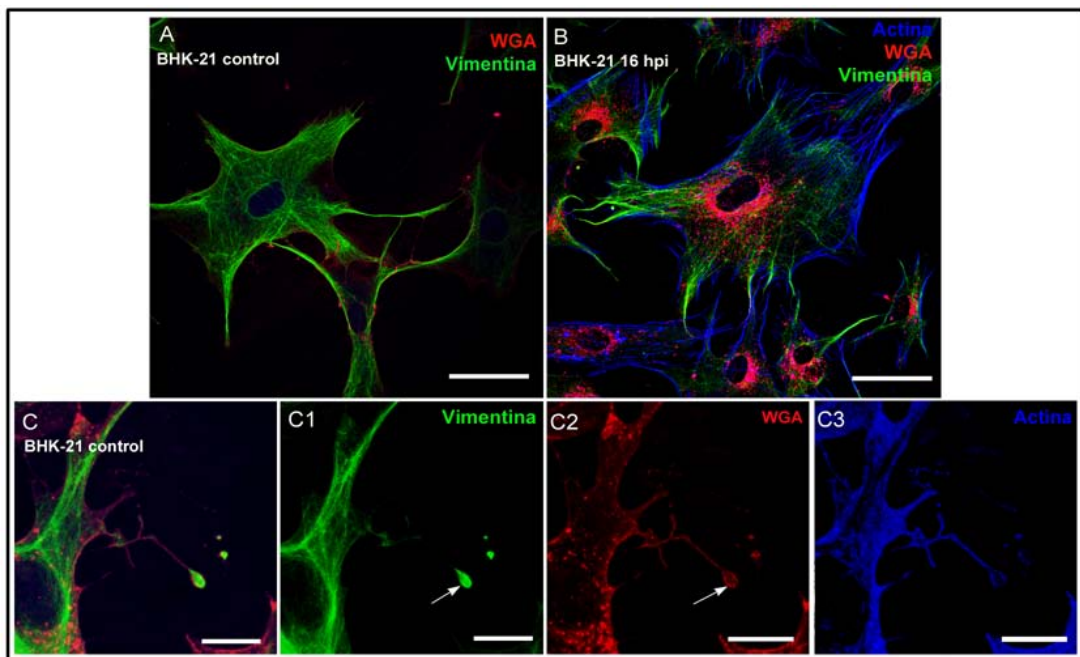


Figura R-14. Distribución de vimentina y actina en células BHK-21 control e infectadas a 16 hpi (1 UFP/célula) en relación con el marcaje de la lectina WGA. Vimentina (verde), actina (azul) y WGA (rojo). (A) Células BHK-21 control; la vimentina se distribuye formando filamentos y en finas prolongaciones. (B) Células BHK-21 infectadas a 16 hpi; la señal de vimentina se detecta en prolongaciones de forma similar a las células control, mientras que la señal de actina marca fibras de estrés en la periferia celular. La señal de la sonda WGA marcó regiones del *trans*-Golgi. En (C) se muestra la proyección de una célula BHK-21 control con una prolongación marcada con la sonda WGA, cuya terminación es similar a las terminaciones de prolongaciones celulares observadas por vídeo-microscopía. Sin embargo, la proyección de la señal de vimentina (C1) y de la sonda WGA (C2) son excluyentes (flechas blancas). (C3) Proyección de la señal de actina que se sitúa en la prolongación pero no en la estructura del extremo. Barras en (A) y (B) 50 μ m, en (C), (C1), (C2) y (C3) 10 μ m.

Debido a que en los cortes ultrafinos estudiados por MET, se detectaron citernas del RER próximos a la membrana plasmática de las células que desarrollaron estructuras membranosas, se estudió por inmunofluorescencia la distribución del retículo endoplasmático en relación a la señal de la sonda WGA en células infectadas. Transcurridas 10 hpi, la señal de RER (detectado con el anticuerpo α -PDI) presentó un patrón reticulado por todo el citoplasma, pero no se detectó en regiones próximas a la membrana plasmática (resultados no mostrados).

Por otro lado, la organización de las estructuras membranosas objeto de estudio, recordaba a la de los lisosomas; por ello, se quiso comprobar si la secreción de lisosomas podría estar relacionada con la formación de estas estructuras. Para detectar lisosomas se utilizó la sonda de célula viva Lysotracker[®] y el anticuerpo específico contra la glicoproteína transmembrana presente en los lisosomas, Lamp-1. No hubo colocalización entre la señal del contorno celular marcado con la sonda WGA y la señal de los dos marcadores de lisosomas en células BHK-21 infectadas a 10 hpi (Figura R-15). Se desestimó por tanto, la naturaleza lisosomal de las estructuras conectadas a la membrana plasmática de células infectadas marcadas con la lectina WGA

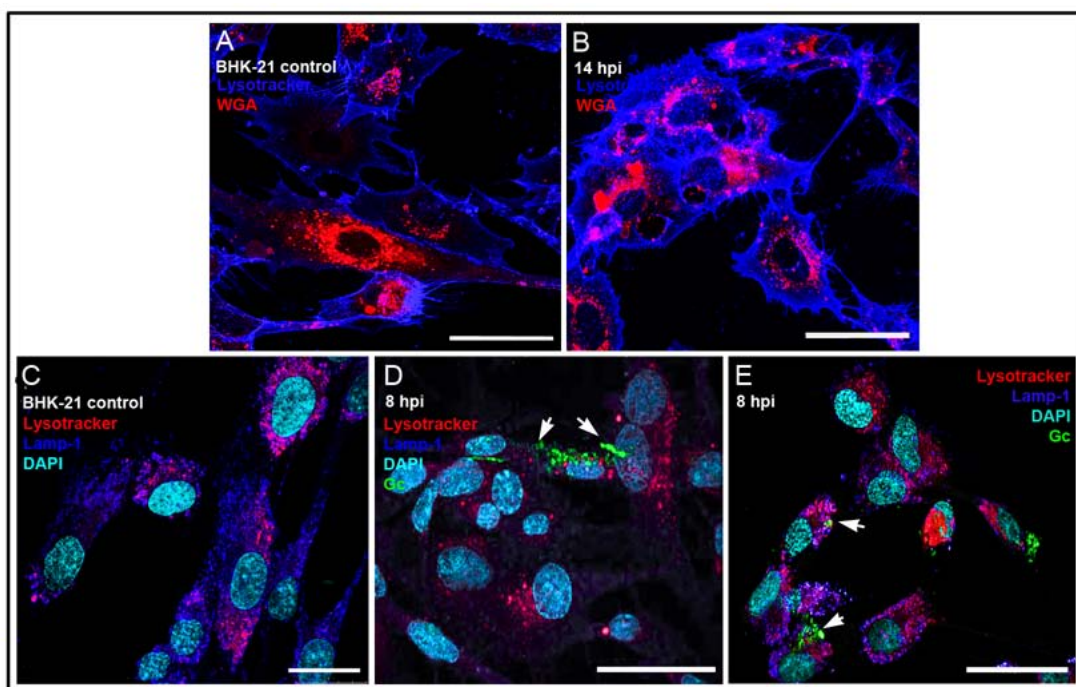


Figura R-15. Distribución de marcadores de lisosomas en células BHK-21 infectadas a 14 y 8 hpi (1 UFP/célula). En (A) y (B) Lysotracker[®] (rojo), WGA 647 (azul). En (C) y (D), Lysotracker[®] (rojo), Lamp-1 (azul), Gc (verde) y DAPI (cian). (A) Células BHK-21 control. (B) Células BHK-21 infectadas a 14 hpi. (C) Células BHK-21 control (D) y (E) Células BHK-21 infectadas a 8 hpi, las flechas indican señal de la glicoproteína Gc. Barras 50 μ m.

Por último se estudió la posible participación de las proteínas cortactina y vinculina en la formación de estructuras membranosas. La cortactina une microfilamentos de actina entre sí, mientras que la vinculina es una proteína de membrana relacionada con adhesiones focales y el anclaje de las integrinas al citoesqueleto de actina. Transcurridas 10 hpi, el patrón filamentoso de cortactina desapareció (Figura R-16-B). También fue el caso de la vinculina (Figura R-16-D). El estudio por inmunofluorescencia de las proteínas cortactina y vinculina demostró

que durante la infección, ambas proteínas perdieron su patrón característico y tampoco parecen estar relacionadas con la formación de estructuras membranas.

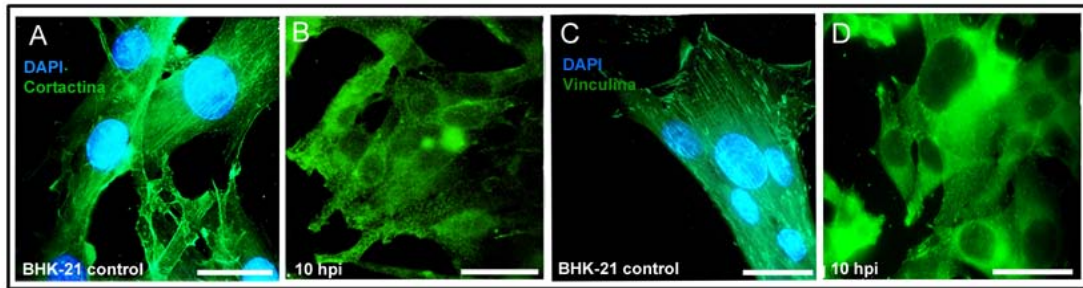


Figura R-16. Distribución de cortactina y vinculina en células BHK-21 control e infectadas a 10 hpi (1 UFP/célula). En (A) y (B) cortactina (verde) y DAPI (azul). En (C) y (D) vinculina (verde) y DAPI (azul). En (A), células BHK-21 control, el patrón de cortactina es filamentoso. En (B), células BHK-21 infectadas a 10hpi desapareció la señal filamentosa de cortactina. En (C) las células BHK-21 control, el patrón de vinculina es filamentoso, próximo a la membrana plasmática. En (D) las células BHK-21 infectadas, la señal de vinculina ha perdido su patrón característica. Barras de 50 μ m.

1.3. Detección de proteínas del citoesqueleto por Western blot.

Muestras procedentes de monocapas de células BHK-21 control e infectadas a 16 hpi, fueron recogidas en tampón Laemmli x2 para estudiar posibles cambios de expresión de proteínas relacionadas con la adhesividad celular y el citoesqueleto celular a 1 UFP/célula. A las horas de infección estudiadas, el 100% de las células BHK-21 se encuentran infectadas. No se detectaron bandas asociadas a la proteína Rho-A ni de integrina- α 4, probablemente por falta de reconocimiento de los anticuerpos en la línea celular BHK-21. Se estudiaron proteínas relacionadas con la adhesividad celular y el citoesqueleto celular (cortactina y vinculina) utilizando la actina como control de carga. En cuanto a los niveles de expresión de la vinculina en las muestras infectadas, no se observaron cambios significativos en comparación con las muestras control (Figura R-17-A). Respecto a cortactina, tampoco se detectaron cambios significativos entre muestras control e infectadas (Figura R-17-B).

Los resultados por Western blot no demostraron cambios significativos de expresión de cortactina y vinculina en células BHK-21 infectadas a 16 hpi.

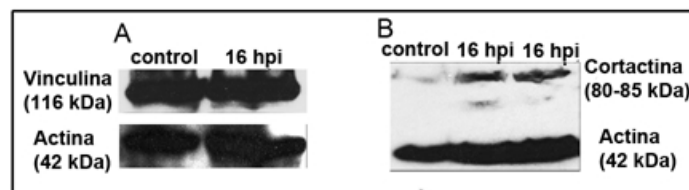


Figura R-17. Western blot procedentes de extractos celulares BHK-21 control e infectados a 16 hpi con VBUN (1 UFP/célula). En cada pocillo se cargaron 20 μ l de muestra en un gel de poliácridamida al 12%. (A) Detección de la proteína vinculina en células BHK-21 control e infectadas. (B) Detección de la proteína cortactina en células BHK-21 control e infectadas.

La inexistente información en la Bibliografía en cuanto a las estructuras membranas, junto al limitado número de anticuerpos de marcadores celulares que son reactivos en células BHK-21, nos llevó a estudiar la posible existencia de las estructuras membranas en células de origen humano infectadas con VBUN. Se utilizaron dos líneas diferentes, MRC-5 y HEp-2, susceptibles a la infección de VBUN (Young y cols., 2003). Las células MRC-5 son fibroblastos embrionarios de pulmón, mientras que HEp-2 son células epiteliales de morfología poligonal. Se

quiso comprobar si en estas células de origen humano infectadas con VBUN se detectaban las estructuras membranas.

El siguiente bloque de resultados recoge los distintos experimentos realizados usando células MRC-5 para estudiar la existencia de las estructuras membranas, así como la caracterización de la infección del virus VBUN en estas células.

2. Infección del VBUN en células humanas MRC-5.

El estudio de posibles estructuras membranas en células MRC-5 comenzó por una caracterización de la infección viral a través de la realización de la curva del crecimiento del VBUN sobre células MRC-5.

2.1. Caracterización de la infección del VBUN en células MRC-5.

2.1.1. Estudio de la progresión de la infección viral usando anticuerpos contra la proteína N y Gc.

En células MRC-5 control se observó que la población era heterogénea, variabilidad que consistió fundamentalmente en el tamaño de las células y sus núcleos. Se hicieron recuentos de 1.100 células MRC-5 control observándose que en el 13,45% de la población, los núcleos fueron superiores a 12 μm de diámetro. También se hizo un recuento de 1.379 células MRC-5 infectadas a 8 hpi y se observó que el 14,45% de las células, presentaron núcleos con diámetro superior a 12 μm .

Se estudió la infección localizando la proteína N, a distintos tiempos de infección (6, 8, 14, 18, 22 y 24 hpi), y se anotó el número de células MRC-5 infectadas para analizar la progresión de la infección en la monocapa durante las horas del estudio (Figura R18). Se detectó señal de N a partir de 8 hpi en el 10% de las células MRC-5 (Figura R-18-B). Transcurridas 14 hpi, el 28,88% de las células presentaron marca con anti-N (Figura R-18-C).

A lo largo de las horas de infección, el porcentaje de células con marca de N se incrementó; así, transcurridas 18 hpi (Figura R-18-D), el 36,55% de las células MRC-5 presentaron fluorescencia y a 22 hpi (Figura R-18-E) el porcentaje fue del 76,26%. Transcurridas 24 hpi, el 81,25% de las células MRC-5 presentaron señal con el anticuerpo anti-N (Figura R-18-F). La progresión de la infección, fue más lenta que en células BHK-21, en las que transcurridas 10 hpi, prácticamente toda la monocapa está infectada.

Se localizó también la glicoproteína Gc, que dio lugar a una señal dispersa por todo el citoplasma en células MRC-5 de núcleos superiores a 12 μm de diámetro. Se realizó un seguimiento a 5, 7, 10, 12, 14, 16, 24 y 48 hpi y la señal del anticuerpo α -Gc fue incrementándose en la monocapa durante el transcurso de la infección. A tiempos cortos de infección, 5 y 7 hpi, el porcentaje de células MRC-5 con señal de Gc y con núcleos de diámetro superior de 12 μm , no superó el 8% de la población. Transcurridas 24 hpi, el 80% de la monocapa presentó señal de Gc, siendo el 16,66% células MRC-5 de núcleos superiores a 12 μm .

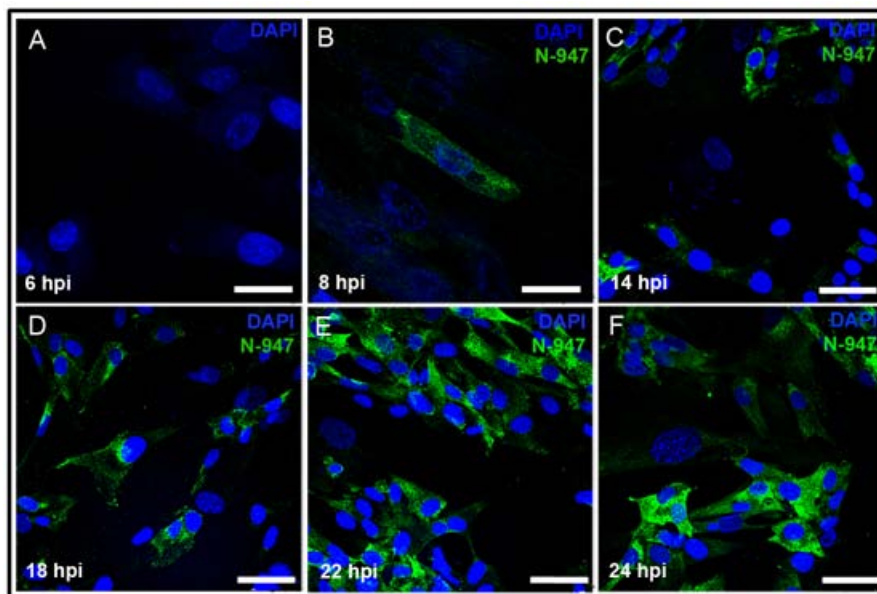


Figura R-18. Distribución de la proteína N en células MRC-5 infectadas con VBUN. N-947 (verde), DAPI (azul). (A) 6 hpi, (B) 8 hpi, (C) 14 hpi, (D) 18 hpi, (E) 22 hpi y (F) 24 hpi. El patrón reticulado de la proteína N no varía a lo largo del tiempo. Barras en (A) y (B) 25 µm y en (C), (D), (E) y (F) 50 µm.

2.1.2. Curva de crecimiento del VBUN crecido en células MRC-5.

Se hicieron diluciones decimales de un stock del VBUN generado y titulado previamente en células BHK-21, con el que se inocularon células MRC-5. Después de 6 dpi, no se visualizaron placas de lisis por lo que se repitió la titulación, revelando los focos de infección mediante inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo α -N-947. La titulación se realizó con cuatro réplicas de células MRC-5 infectadas con diluciones decimales conocidas.

Los recuentos de focos de fluorescencias se realizaron en la dilución 10^{-4} . Se contaron 3 focos de fluorescencia aislados en esta dilución (Figura R1-19), lo que significó que el título viral producido transcurridos 6 dpi fue de $1,75 \times 10^5$ UFF/ml (Unidad de Foco de Fluorescencia/mililitro).

Se infectaron células MRC-5 a 1 UFF/célula y a 0,1 UFF/célula y se recogieron los sobrenadantes para ser titulados en células MRC-5 y BHK-21. Transcurridos 6 dpi, se observaron placas de lisis en las células BHK-21 pero no en células MRC-5. Se repitió el experimento y al cabo de 6 dpi, se volvieron a encontrar placas de lisis en las células BHK-21 mientras que en las células MRC-5 se intentó revelar la titulación por focos de fluorescencias sin éxito.

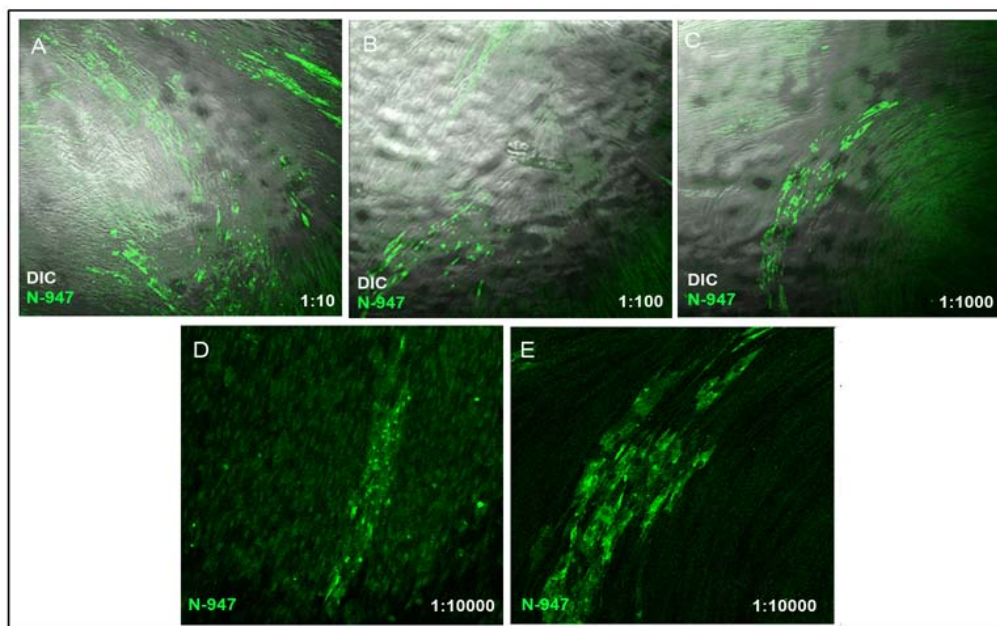


Figura R-19. Inmunotitulación del stock de VBUN en células MRC-5 infectadas con el VBUN a través de focos de fluorescencia. (A) Proyecciones DIC y señal fluorescente correspondiente a la proteína N. Monocapa de células MRC-5 infectadas con VBUN a 6 dpi y dilución 10^{-1} . (B) Monocapa de células MRC-5 infectadas con VBUN a 6 dpi y dilución 10^{-2} . (C) Monocapa de células MRC-5 infectadas con VBUN a 6 dpi y dilución 10^{-3} . (D) y (E) Dilución 10^{-4} .

Las placas de lisis en células BHK-21 producidas por virus VBUN procedentes de células MRC-5, fueron de menor diámetro que las producidas por virus procedentes de las mismas células BHK-21. Infectando a 1 UFF/célula se alcanzó un título viral máximo transcurridas 18 hpi (Figura R-20). A partir de 40 hpi disminuyó el título progresivamente hasta 96 hpi. Al infectar a 0,1 UFF/célula, la curva alcanzó un máximo transcurridas 96 hpi. Transcurridas 140 hpi, no se observó una brusca disminución en la curva infectando a 0,1 UFF/célula. Al infectar a 1 UFF/célula, la producción viral se mantuvo constante hasta las 40 hpi. A partir de este tiempo, la producción viral decayó debido a la muerte de las células MRC-5 por desprendimiento en la placa de cultivo y el probable deterioro de las partículas virales presentes en el medio. Al infectar con un inóculo 10 veces menor, la liberación de las nuevas partículas virales al medio fue más progresiva y no se produjo una caída en el título viral tan acusado como en la curva obtenida al infectar a 1 UFF/célula.

Utilizando técnicas de inmunotitulación en células MRC-5 infectadas, se pudo conocer el título máximo alcanzado de un stock conocido de VBUN, que fue de 10^5 UFF/ml. En células BHK-21 infectadas, este mismo stock viral, alcanzó un título viral superior, que fue de $2,1 \cdot 10^7$ UFF/ml. Sin embargo, no se pudo titular sobre células MRC-5 el virus VBUN liberado de estas mismas células, ni por ensayos de placas de lisis, ni por focos de fluorescencia, impidiendo conocer exactamente las UFF/célula durante la infección. Debido a esto, los virus procedentes de células MRC-5, fueran titulados siempre por ensayo de placa de lisis sobre células BHK-21. Por lo que los valores de infectividad de los stocks en células MRC-5 son aproximados, aunque cuantificando el número de células MRC-5 fluorescentes infectadas a 1 UFF/célula se obtuvieron valores equivalentes a los ensayos con células BHK-21 a 1 UFF/célula.

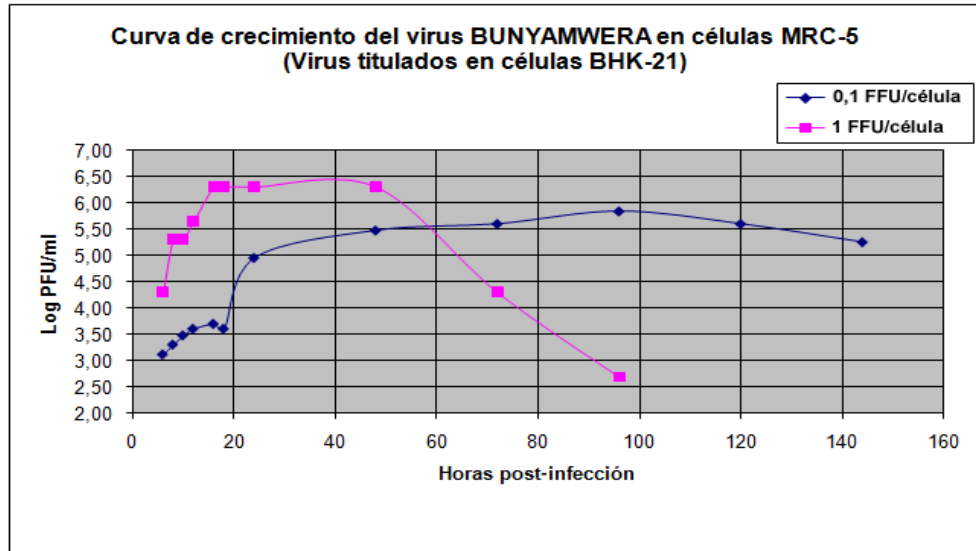


Figura R-20. Curva de crecimiento del virus VBUN procedente de células MRC-5 en células BHK-21. La curva rosa indica la cantidad de virus producido a 1 UFF/célula y recogidos desde 6 hasta 96 hpi. La curva azul indica la titulación del virus a 0,1 UFF/célula recogidos desde 6 hasta 140 hpi.

2.1.3. Distribución de la glicoproteína Gc en células MRC-5 infectadas.

Se estudió la distribución de la glicoproteína Gc, uno de nuestros marcadores de ensamblaje viral, en relación a las regiones *trans*-Golgi y *cis-media*-Golgi, marcadas con la sonda WGA y el anticuerpo anti-Gigantina respectivamente, para comprobar cuáles eran las regiones del aparato de Golgi en las que se acumulaba la glicoproteína Gc, en donde se localiza por tanto el ensamblaje del virus. En el primer ensayo, se realizó un seguimiento de la infección a distintos tiempos (6-48 hpi) infectando a 1 UFF/célula. La distribución de la señal de la glicoproteína Gc, se detectó en zonas perinucleares en las primeras horas de infección. Transcurridas 10-12 hpi, la distribución del marcaje del anticuerpo α -Gc, se observó próxima a la membrana plasmática y en filamentos (Figuras R-21-A y R-21-D). Se repitió el estudio utilizando un anticuerpo específico de la región del *trans*-Golgi, TGN-46 (Figuras R-21-B y R-21-E). No se detectó colocalización entre las señales de TGN-46 y Gc. Tampoco se detectó colocalización entre el marcador de la región *trans*-Golgi, WGA y Gc (Figuras R-21-C y R-21-F).

Sí se observó la colocalización entre la glicoproteína Gc y la señal de Gigantina (Figura R-21-F), por lo que se demostró que, al igual que en células BHK-21, el VBUN en estas células se ensambla en la región *cis* del aparato de Golgi. En células MRC-5 cuyos núcleos fueron anormalmente grandes, la señal de Gc fue punteada por todo el citoplasma y no se detectó colocalización con Gigantina. Por lo que en estas células la infección parece progresar de manera diferente.

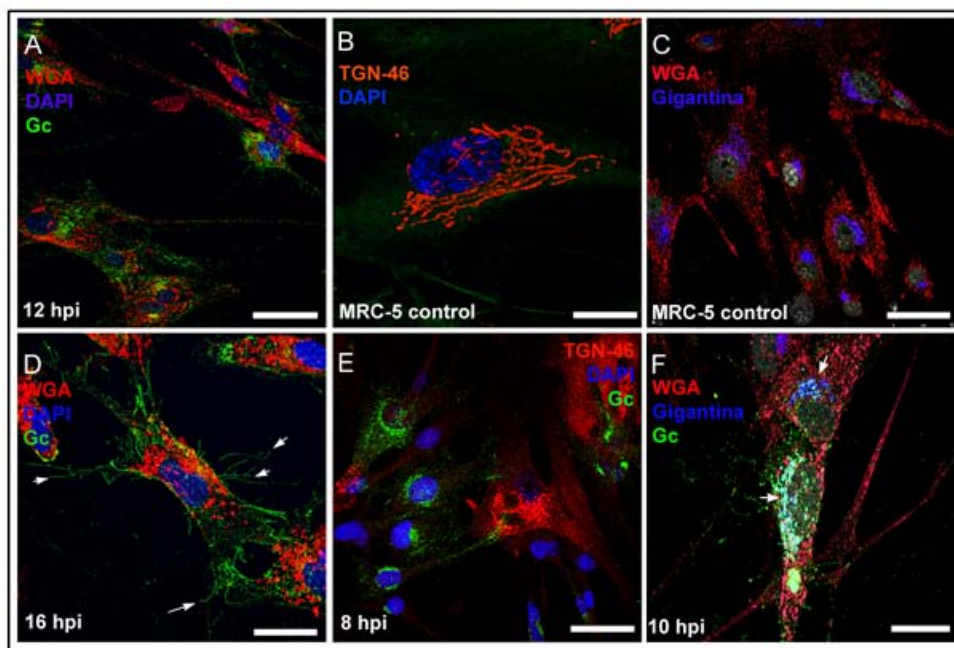


Figura R-21. Distribución de la glicoproteína Gc y el aparato de Golgi en células MRC-5 infectadas con VBUN (1 UFF/célula). En (A) y (D), células MRC-5 infectadas a 12 y 16 hpi, respectivamente (1 UFF/célula), WGA (rojo), Gc (verde) y DAPI (azul). La sonda WGA marcó la región del *trans*-Golgi. En (D) se observan filamentos marcados con anti-Gc (flechas blancas). (B) y (E) Estudio de la región *trans*-Golgi usando un anticuerpo contra la proteína TGN-46. TGN-46 (rojo), Gc (verde) y DAPI (azul). (B) Células MRC-5 control. (E) Células MRC-5 infectadas a 8 hpi (1 UFF/célula). (C) y (F) Estudio de la región *cis-media* del aparato de Golgi. WGA (rojo), Gc (verde), Gigantina (azul). En (C) Células MRC-5 control. En (F) células MRC-5 infectadas a 10 hpi (1 UFF/célula), la flecha blanca indica la región de colocalización entre Gc y Gigantina (color cian). Barra en (A), (C), (D) y (E) de 50 μ m, y en (B) y (F) 25 μ m.

2.1.4. Marcadores de lisosomas y mitocondrias en células MRC-5 infectadas.

La organización multilamellar de las estructuras membranosas observadas en células BHK-21 infectadas, recordó a la ultraestructura multilamellar de lisosomas. Aunque en células BHK-21 se demostró que no había relación entre las estructuras membranosas marcadas con la sonda WGA y marcadores de lisosomas, se quiso comprobar si en células MRC-5 infectadas con el VBUN, existe esta relación, o si el sistema lisosomal participa en las células MRC-5 que no ensamblan el virus en la región *cis-media* Golgi.

Se estudió la distribución de los lisosomas utilizando la sonda en células vivas, Lysotracker[®], y un anticuerpo específico de la glicoproteína transmembrana de lisosomas, Lamp-1. La señal de la sonda Lysotracker[®] y la señal del anticuerpo Lamp-1 no colocalizaron completamente. Este resultado puede ser explicado porque la sonda marca preferentemente lisosomas, pero también, otras vesículas de naturaleza ácida. Sin embargo, el anticuerpo anti-Lamp-1 se dirige, exclusivamente, a la membrana de los lisosomas. También se estudió la distribución de CD63 (marcador de lisosomas, endosomas tardíos y cuerpos multivesiculares), junto a la distribución de las mitocondrias durante la infección, marcadas con Mitotracker[®]. CD63 es una tetraspanina con cuatro dominios transmembrana que organizan en la membrana plasmática los receptores de adhesión (Barreiro y Sánchez-Madrid, 2009).

En células MRC-5 infectadas a 8-12 hpi (1 UFF/célula), no se observó colocalización entre marcadores de lisosomas (Lysotracker[®] y Lamp-1) y la señal de la glicoproteína Gc. Sin embargo, sí se observó reclutamiento a regiones perinucleares de la señal de mitocondrias. No se detectó señal lisosomal ni mitocondrial próxima a la membrana plasmática. Respecto a la distribución de CD63 en células infectadas con el virus recombinante VBUN-GFP-NSm (rBUNM-NSm-EGFP) transcurridas 8 hpi (Figura R-22), se observó proximidad en la localización de ambas señales al estudiar los planos confocales. Durante la infección del VBUN en células MRC-5, se intensificó la señal de Lysotracker[®], Lamp-1 y CD63 en regiones perinucleares probablemente, debido al reclutamiento de orgánulos a estas regiones. La señal del virus VBUN-GFP-NSm también se detectó en regiones perinucleares pero no se detectó una colocalización real con los marcadores lisosomales, tanto en células con núcleos de más de 12 µm de diámetro como en el resto.

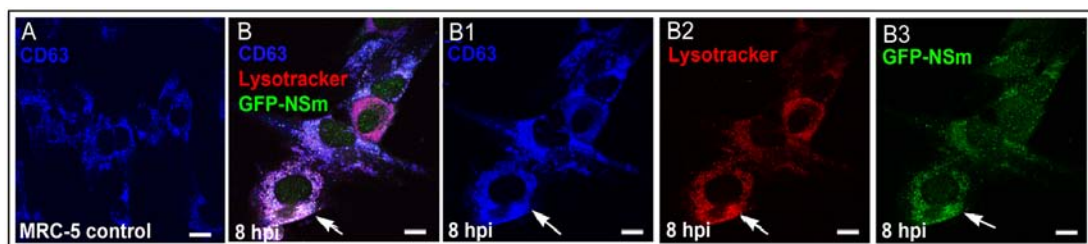


Figura R-22. Distribución de marcadores lisosomales (CD63 y Lysotracker[®]) y el virus VBUN-GFP-NSm en células MRC-5. CD63 (azul), Lysotracker[®](rojo) y VBUN-GFP-NSm (verde). (A) Células MRC-5 control. (B) Proyección total de las proyecciones de CD63 (B1), Lysotracker[®] (B2) y VBUN-GFP-NSm (B3) de células MRC-5 infectadas a 8 hpi (1 UFF/célula). Las flechas blancas indican regiones perinucleares donde las tres señales localizan. Barras 10 µm.

Los resultados de la distribución de marcadores lisosomales (Lysotracker[®], Lamp-1 y CD63) en células MRC-5 infectadas con el VBUN-GFP-NSm demostraron que durante la infección se reorganizaron en regiones próximas al núcleo celular. Por tanto, las membranas de origen lisosomal no están relacionadas con la morfogénesis del VBUN en células MRC-5.

2.1.5. Estudio del sitio de replicación del VBUN en células MRC-5 utilizando Bromouridina.

Para identificar el lugar de ensamblaje del complejo replicativo del VBUN en células MRC-5, se añadió Bromouridina (BrUr) a células vivas e infectadas. La Bromouridina es un compuesto que se ha utilizado para marcar la síntesis de nuevas hebras de ARN (Koberna y cols., 2000). Aunque está descrito que en células BHK-21 existe un silenciamiento celular provocado por el VBUN (Shi y cols., 2009), nos aseguramos de que la única señal de ARN observada en células MRC-5 infectadas, fuera de origen viral. Para ello se añadió la droga actinomicina-D. Esta droga fue añadida 30 min antes de la adición de BrUr para bloquear la transcripción celular y la elongación por parte de la ARN polimerasa tipo II (Yu, 1980) ya que se une al ADN. Para el estudio se usó el doble de multiplicidad de infección (2 UFF/célula) para favorecer la visualización de ARN de nueva síntesis. No se detectó colocalización total entre Gc y BrUr, aunque sí se detectaron en las mismas regiones perinucleares (Figura R-23). La glicoproteína Gc no forma parte de los complejos replicativos en células MRC-5 infectadas con el VBUN, pero sí de los sitios de ensamblaje en el

aparato de Golgi, donde parecen localizarse también los complejos replicativos, al igual que en células BHK-21.

También se estudió la relación de la señal de BrUr con la de CD63 para comprobar si los lisosomas, endosomas tardíos y cuerpos multivesiculares tenían relación con el sitio de replicación viral. No se detectó colocalización entre CD63 y BrUr (resultados no mostrados). Por tanto, el sistema lisosomal en células MRC-5 infectadas con VBUN no alberga el sitio de replicación viral.

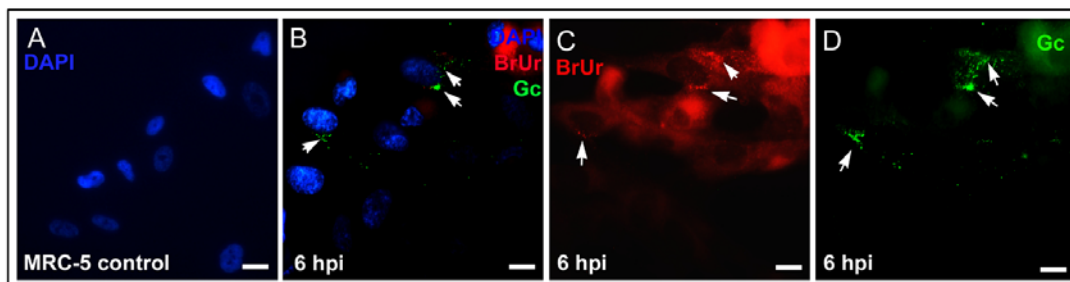


Figura R-23. Detección del sitio de ensamblaje del VBUN en células MRC-5 infectadas usando BrUr y tratadas con actinomicina-D. (A) Células MRC-5 control. En (B) BrUr (rojo), Gc (verde) y DAPI (azul). Células MRC-5 infectadas a 6 hpi (2 UFF/célula), las flechas indican regiones perinucleares en las que se detectó señal de BrUr (C) y Gc (D) muy próximas. Barras de 10 μ m.

2.1.6. Estudio de filamentos intermedios en células MRC-5 infectadas.

La vimentina, junto a queratinas (en células epiteliales), desminas (en fibroblastos) y neurofilamentos (células nerviosas), es una proteína que forma parte de los filamentos intermedios, imprescindibles para regular la homeostasis celular. Se estudió el posible cambio de distribución de la vimentina durante la infección de VBUN en células MRC-5. Recientemente, en estudios realizados con el virus del Dengue, se ha observado que la disrupción de los filamentos intermedios reduce tanto la replicación y liberación viral como la expresión de proteínas virales (Kanlaya y cols., 2010).

En células MRC-5 infectadas a 10 hpi (1 UFF/célula), la vimentina se concentró en regiones perinucleares (Figura R-24-B y R-24-C). La señal de GFP-NSm, otro marcador del ensamblaje viral y de la factoría viral del VBUN, se distribuyó próxima al núcleo celular a 10 hpi (Figura R-24-C). Transcurridas 16 hpi (Figura R-24-D y R-24-E), la señal de vimentina se detectó en regiones perinucleares pero sin colocalización con la señal de GFP-NSm. Se quiso comprobar si este reclutamiento a regiones perinucleares de la vimentina estaría relacionado con las denominadas “cajas de vimentina” características de los agresomas. Para ello, se estudió otro componente de los agresomas, la proteína γ -tubulina, que se localiza específicamente en el Centro Organizador de Microtúbulos (McNaughty cols., 2002). Transcurridas 10 hpi, se observó reclutamiento de la señal de vimentina a regiones perinucleares y próxima a ella, la señal de la proteína N, pero sin existir colocalización (Figura R-24-F). También la señal de γ -tubulina se situó en regiones perinucleares en forma de un punto intenso, sin detectarse colocalización entre la señal de vimentina y la proteína N (Figuras R-24-G y R-24-H).

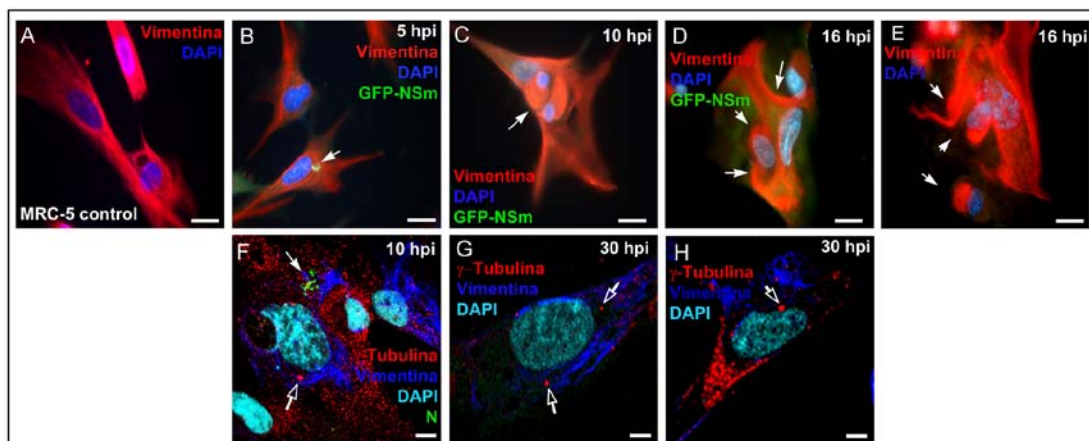


Figura R-24. Distribución de vimentina en células MRC-5 infectadas con VBUN (1 UFF/célula). En (A) hasta (E), vimentina (rojo), VBUN-GFP-NSm (verde) y DAPI (azul). (A) Células MRC-5 control. Células MRC-5 infectadas a (B) 5 hpi, (C) a 10 hpi, (D) y (E) a 16 hpi. En (B) la flecha blanca marca la señal de GFP-NSm. En (C), (D) y (E) las flechas blancas indican la redistribución de la señal de vimentina a regiones perinucleares. Desde (F) hasta (H) γ -tubulina (rojo), vimentina (azul), N (verde), DAPI (azul). (F) Células MRC-5 infectadas a 10 hpi, la flecha blanca marca anti-N (G) y (H) Células MRC-5 infectadas a 30 hpi, las flechas indican señal de γ -tubulina. Barras en (A), (B), (C), (D) y (E) 25 μ m, en (F), (G) y (H) 10 μ m.

Como consecuencia de la citotoxicidad de la infección del VBUN, las células MRC-5 se redondearon, perdiendo su morfología de fibroblasto, lo que podría explicar en parte, la concentración de la señal de vimentina en regiones perinucleares. Esta distribución podría deberse también al reclutamiento de orgánulos celulares durante la formación de la factoría viral. En resultados no mostrados, se detectó colocalización entre marcadores de mitocondrias (MitoTracker[®]) y vimentina en regiones perinucleares a 36 hpi. No se detectó colocalización de la señal de vimentina con marcadores virales de ensamblaje como la proteína GFP-NSm o con la proteína N y la señal de γ -tubulina.

En conclusión, la redistribución de la señal de vimentina durante la infección del VBUN en células MRC-5, parece estar relacionada con el cambio de morfología celular y con el reclutamiento de orgánulos a regiones de la factoría viral, pero no con la formación de cajas de vimentina y de agresomas.

2.1.7. Factoría viral del VBUN en células MRC-5

En células MRC-5 infectadas a 8 hpi se observó reclutamiento de mitocondrias y sáculos de RER alrededor de cisternas de aparato del aparato de Golgi en regiones perinucleares. La maduración de los virus ocurrió en el interior de las cisternas del aparato de Golgi (Figura R-25-A) de manera similar a lo que ocurre en células BHK-21. Los núcleos se arriñonaron para generando cavidad que da cabida a la factoría viral. Se observó un alto grado de dilatación y fragmentación del aparato de Golgi junto al alargamiento e incremento del contraste de las mitocondrias. En algunas de ellas, se observaron estructuras tubulares insertadas en la membrana, recordando a los tubos virales caracterizados en células BHK-21 y que son las estructuras que albergan el complejo replicativo del virus (Fontana y cols., 2008).

En la Figura R-25 se muestra la zona de ensamblaje del VBUN por MET y la formación de la factoría viral por inmunofluorescencia.

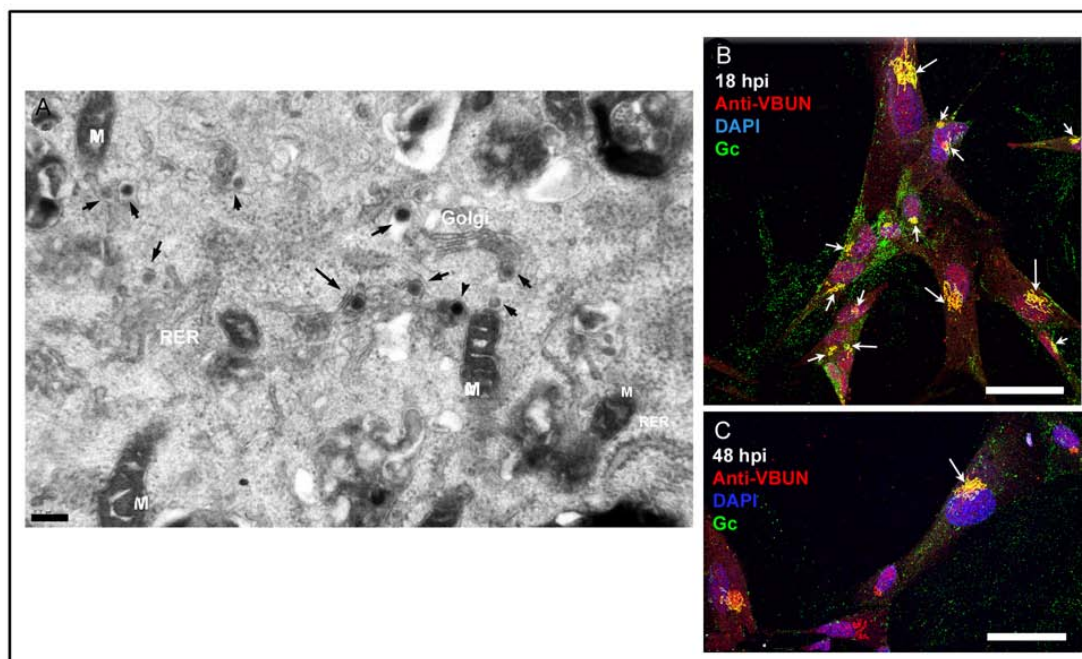


Figura R-25. Zona de ensamblaje y factoría viral del VBUN en células MRC-5. (A) Micrografía electrónica de una sección de 75 nm de grosor del citoplasma de una célula MRC-5 infectada a 16 hpi con VBUN (1 UFF/célula), en donde se observa el ensamblaje del virus VBUN en zonas entre 4-6 μm de altura desde la base celular. (M) mitocondria, (RER) retículo endoplasmático rugoso y (Golgi) aparato de Golgi. Las flechas negras indican los virus madurando en las cisternas de Golgi; alrededor se reclutan mitocondrias altamente contrastadas y sáculos de RER. También se observan vesículas con contenido denso a los electrones. En (B) y en (C) Glicoproteína Gc (verde), anticuerpo policlonal anti-VBUN (rojo), DAPI (azul). Se observa la factoría viral a 18 y 48 hpi respectivamente. Las flechas blancas indican colocalización de los dos anticuerpos contra componentes virales en región yuxtannuclear al estudiar los planos confocales. El núcleo se ha deformado para albergar la factoría viral. Barra en (A) 200 nm, en (B) y (C) 50 μm .

2.2. Descripción de estructuras membranas mediante MET.

2.2.1. Inclusiones en Epoxi-resina EML-182

Una vez caracterizada la infección del VBUN en células MRC-5 y tras comprobar las similitudes con la infección en células BHK-21, se estudiaron células MRC-5 control e infectadas a 16 hpi (1 UFF/célula) mediante microscopía electrónica de transmisión. Las células MRC-5 control, presentaron morfología alargada típica de fibroblasto con numerosas prolongaciones de varias micras de longitud. Se observaron vesículas relacionadas con procesos de endocitosis y exocitosis próximas a la membrana plasmática. En células control se detectaron estructuras membranas similares a las encontradas en células BHK-21 control. A menudo las conexiones con la membrana plasmática aparecieron aparentemente aisladas y alejadas de la célula. No se observó conexión con orgánulos intracelulares, pero sí con la membrana plasmática (Figura R-26).

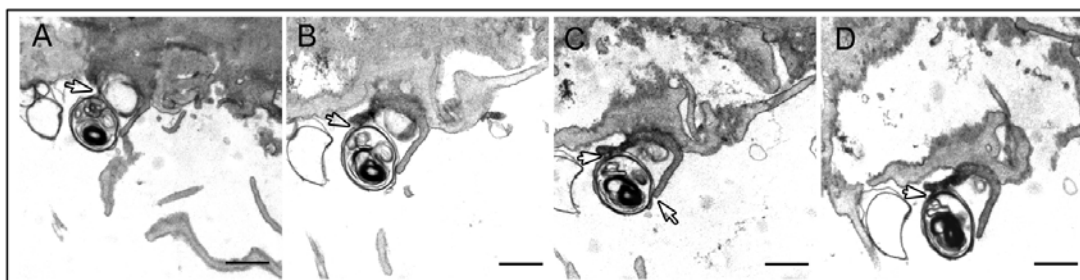


Figura R-26. Micrografías electrónicas de secciones seriadas de 75 nm de grosor de estructuras membranosas de células MRC-5 control en regiones basales. Las flechas blancas indican conexión de la última membrana que forma parte la estructura con la membrana plasmática. (A) A 0,45 μm de altura desde la base celular, (B) 0,75 μm de altura desde la base celular, (C) 0,825 μm de altura desde la base celular y (D) 0,925 μm de altura desde la base celular. Barras 100 nm.

Todos los experimentos de monocapas de células MRC-5 infectadas con VBUN se realizaron a 1 UFF/célula. Transcurridas 16 hpi, se localizaron estructuras membranosas en zonas basales, siendo más numerosas y complejas que en células MRC-5 control. Estas estructuras están constituidas por lamelas membranosas apiladas entre sí cuyo espaciado es bastante regular. Se midieron las distancias entre lamela y lamela de 10 estructuras membranosas de células MRC-5 infectadas y se encontraron distancias comprendidas entre los 10 nm hasta los 20 nm, coincidiendo con las distancias encontradas en las estructuras multilamelares de las células BHK-21 infectadas con VBUN. Las estructuras multilamelares detectadas en regiones basales de células MRC-5 infectadas son estructuras frágiles y densas en MET. Este contraste puede deberse al apilamiento de membranas lipídicas altamente contrastadas por la fijación con tetróxido y la posterior post-tinción con metales pesados. En los planos más basales no se detectó conexión directa con la célula, pero en cortes más apicales se detectaron finas conexiones con la membrana plasmática. En otras ocasiones, la conexión con la célula no se detectó en cortes seriados. Ocasionalmente, las estructuras aparecieron entre dos células unidas por la membrana plasmática de ambas. En cortes basales, la estructura se encontró en prolongaciones celulares (Figuras R-27-A y R-27-B). Los virus extracelulares próximos a estas estructuras fueron escasos (Figura R-27-B). Entre 0,5-0,8 μm de altura desde la base celular, se detectaron estructuras membranosas conectadas con prolongaciones celulares (Figuras R-27-E y R-27-F). Asimismo, entre 3-4 μm de altura desde la base celular se encontraron estructuras membranosas (Figura R-27-G) conectadas con la membrana plasmática. En cortes más apicales desde la base celular, también se encontraron estructuras membranosas (Figuras R-27-H y R-27-I). La existencia de estructuras membranosas por encima de 3-4 μm de altura desde la base celular, se observó en células MRC-5 que quedaron incluidas unas micras por encima de la base del sustrato.

Las estructuras membranosas encontradas en células MRC-5 infectadas con VBUN alcanzaron una altura de 500 nm desde la base celular, coincidiendo con la altura de las estructuras membranosas detectadas en células BHK-21 infectadas.

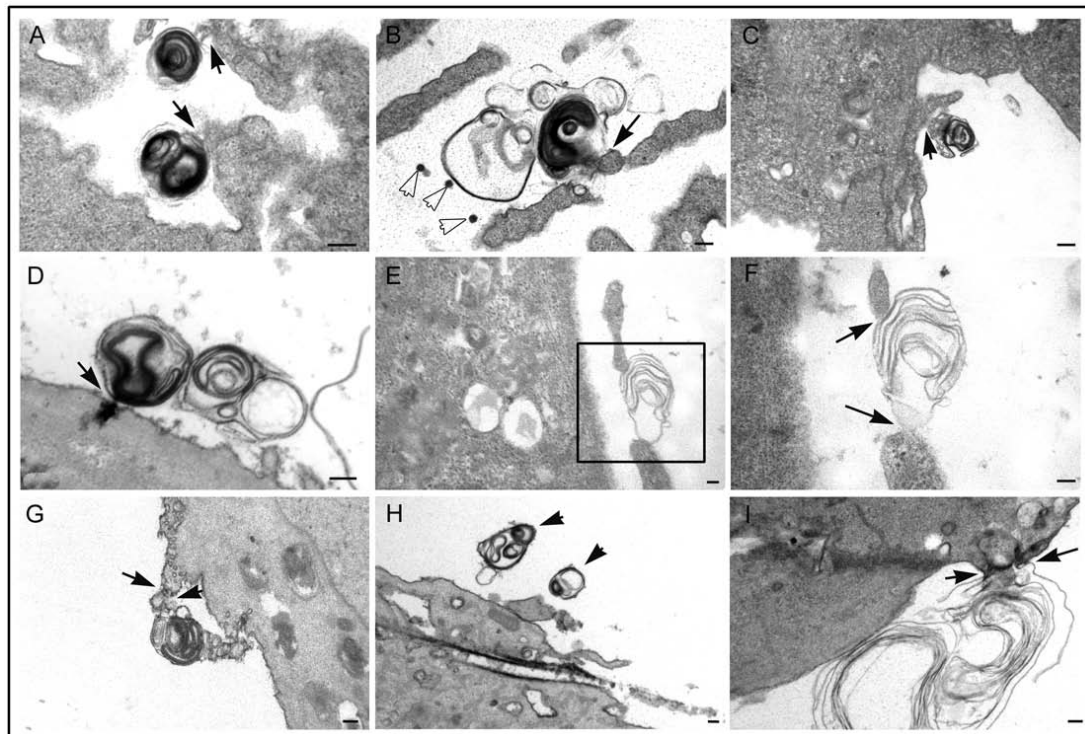


Figura R-27. Micrografías electrónicas de estructuras membranosas detectadas en células MRC-5 infectadas con el VBUN a 16 hpi (1 UFF/célula). Cortes de microscopía electrónica de 75 nm de grosor. (A) y (B) Estructuras membranosas situadas a 0,3 μm de altura desde la base celular. En (A), las flechas indican estructuras membranosas. En (B), las flechas blancas son virus extracelulares junto a la estructura membranosa. (C) Estructura membranosa situada a 0,650 μm de altura desde la base celular. (D) Estructura membranosa situada a 0,8 μm de altura desde la base celular. (E) y (F) Cortes de 90 nm de grosor, situados entre 0,5-0,8 μm de altura desde la base celular. La estructura membranosa aparece entre dos prolongaciones celulares (flechas negras). (G) Estructura membranosa situada entre 3-4 μm de altura desde la base celular. (H) e (I) Estructuras membranosas situadas entre 4-6 μm de altura desde la base celular. En (I), las flechas negras indican continuidad de la estructura con la membrana plasmática. Barras en (A), (D), (E) y (F), 100 nm, y en (B), (C), (G), (H) e (I), 200 nm.

El estudio de cortes ultrafinos y seriados de estructuras membranosas procedentes de regiones basales en células MRC-5 infectadas (Figura R-28), reveló la conexión con la membrana plasmática en determinados planos (Figuras R-28-C, R-28-D y R-28-H), pero ninguna conexión con orgánulos intracelulares coincidiendo con las estructuras membranosas visualizadas en células BHK-21 infectadas con el VBUN.

Las estructuras membranosas visualizadas en células MRC-5 infectadas con el VBUN presentaron un diseño estructural multilamelar similar al diseño estructural detectado en células BHK-21 infectadas.

Para evitar posibles roturas de las estructuras membranosas durante el proceso de fijación, se estudiaron células MRC-5 infectadas a 16 hpi (1 UFF/célula) fijando las monocapas sin retirar el medio de cultivo. En cortes basales, a 0,75 μm de altura desde la base celular, se observaron estructuras membranosas entre dos células con conexión a la membrana plasmática (Figura R-29-A). Aproximadamente, a 1 μm de altura desde la base celular, se observaron conexiones con la célula y la lamela más externa de la estructura membranosa (Figura R-29-B). En cortes superiores, a 2,035 μm de altura desde la base celular, se observaron estructuras multilamelares sin conexión aparente con la célula (Figuras R-29-C y R-29-D). Las conexiones más

evidentes con la membrana plasmática se observan en las Figuras R-29-E, R-29-F y R-29-G.

En las muestras de células MRC-5 infectadas con VBUN y fijadas sin retirar el medio de cultivo, se observaron estructuras membranosas mejor preservadas en las que se pudo detectar la individualidad de cada una de las lamelas. Además, la conexión con la membrana plasmática se observó entre las lamelas más externas que forman parte de las estructuras. No se observó conexión con orgánulos intracelulares.

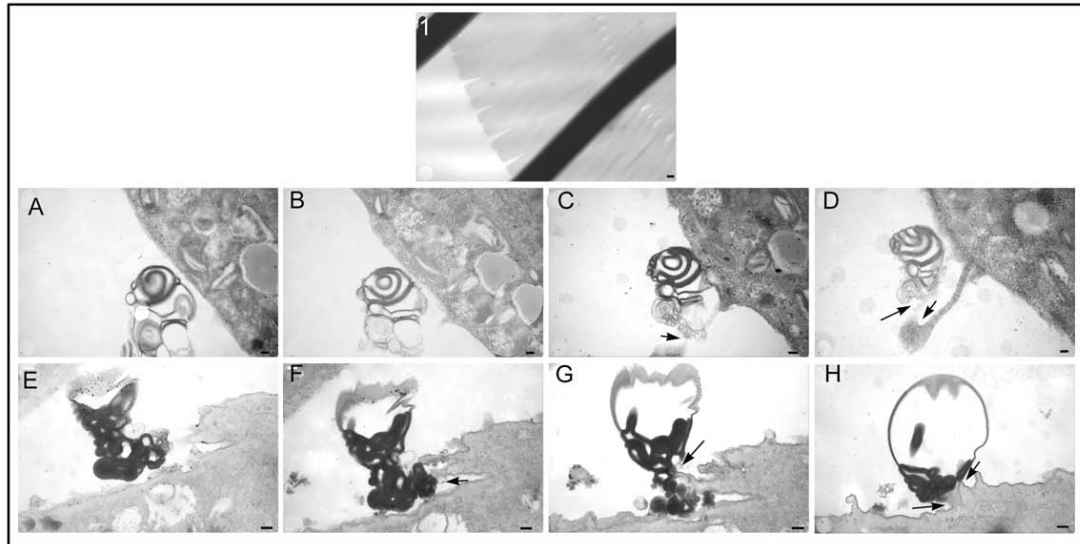


Figura R-28. Micrografías electrónicas seriadas de estructuras membranosas en células MRC-5 infectadas a 18 hpi (1 UFF/célula). (1) Imagen de baja magnificación de los cortes seriados. Desde (A) hasta (D), cortes de 75 nm de grosor y seriados de una estructura membranosa. (A) A 0,070 μm de altura desde la base celular. (B) A 0,140 μm de altura desde la base celular. (C) A 0,210 μm de altura desde la base celular. (D) A 0,350 μm de altura desde la base celular. Desde (E) hasta (H), seriado de estructura membranosa. (E) A 0,140 μm desde la base celular. (F) A 0,210 μm desde la base celular. (G) A 0,350 μm desde la base celular. (H) A 0,420 μm desde la base celular. Barra en (1), 20 μm , en (A) hasta (D), 100 nm y en (E) hasta (H), 200 nm.

Finalmente, se realizaron también cortes perpendiculares a la base de células MRC-5 infectadas (Figura R-30). Se pudo detectar que las estructuras membranosas aparecieron en la zona de contacto con el sustrato, en la región basal (Figura R-30-A). Además, se visualizaron estructuras membranosas sin aparente conexión con la célula y en regiones apicales (R-30-B). Estas estructuras podrían proceder de otras conexiones celulares, pertenecientes a células situadas a varias micras de distancia. Las estructuras membranosas aparecieron rodeadas de una membrana exterior (Figura R-30-B), que se conecta con la membrana plasmática. Se midió la distancia en longitud de 6 puntos de la estructura observada en la Figura R-30-C y se obtuvo una media 159,06 nm \pm 38,55 nm. Se observaron estructuras membranosas situadas entre dos células, en posiciones basales y conectadas con las respectivas membranas plasmáticas (Figura R-30-D).

Los cortes perpendiculares proporcionaron, por tanto detalles adicionales de las estructuras membranosas en regiones basales próximas a la base del sustrato, situándose algunas de ellas entre células situadas una encima de otra.

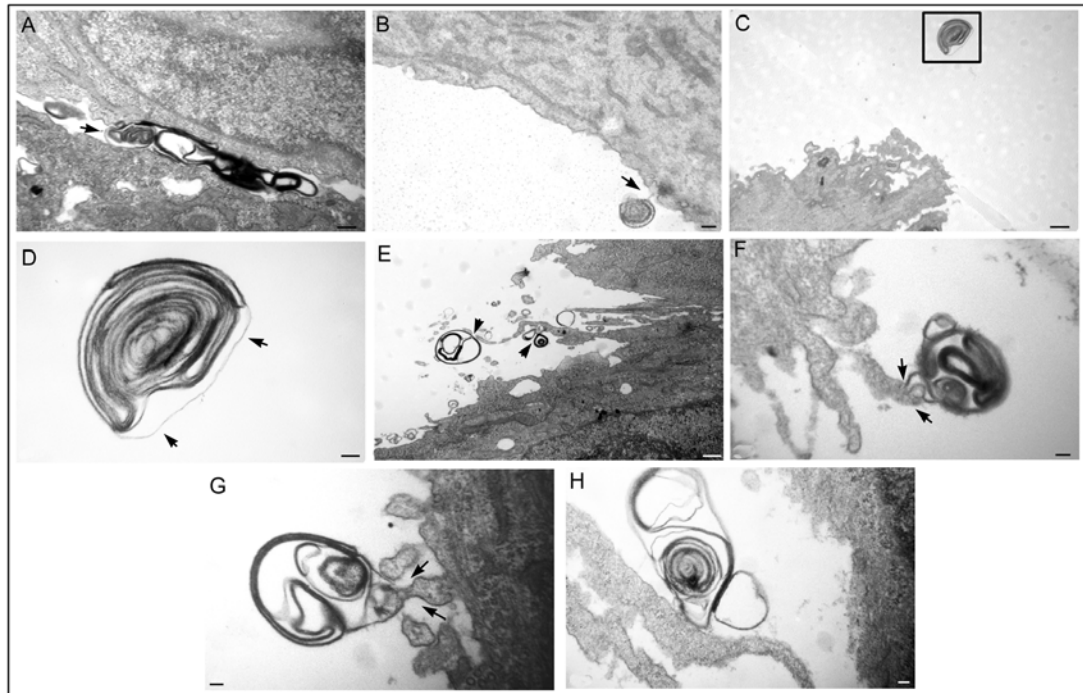


Figura R-29. Micrografías electrónicas de estructuras membranosas detectadas en células MRC-5 infectadas a 16 hpi (1 UFF/célula) y fijadas con el medio de cultivo. (A) Estructura membranosa situada entre dos células a 0,750 μm de altura de la base celular. (B) Estructura membranosa unida a la membrana plasmática a 1 μm de altura de la base celular. (C) Estructura membranosa aparentemente aislada de la célula a 2,030 μm de altura de la base celular. (D) Detalle de (C); las flechas indican la lamela más externa de la estructura. (E), (F), (G) y (H) Estructuras membranosas asociadas a prolongaciones celulares; las flechas indican conexión con la membrana. (E) A 2,5 μm de altura desde la base celular. (F) y (G) A 8,3 μm de altura desde la base celular. (H) A 10,17 μm de altura desde la base celular. Barra en (A) y (B) 200 nm, en (C) y (E) 500 nm y en (D), (F), (G) y (H) 100 nm.

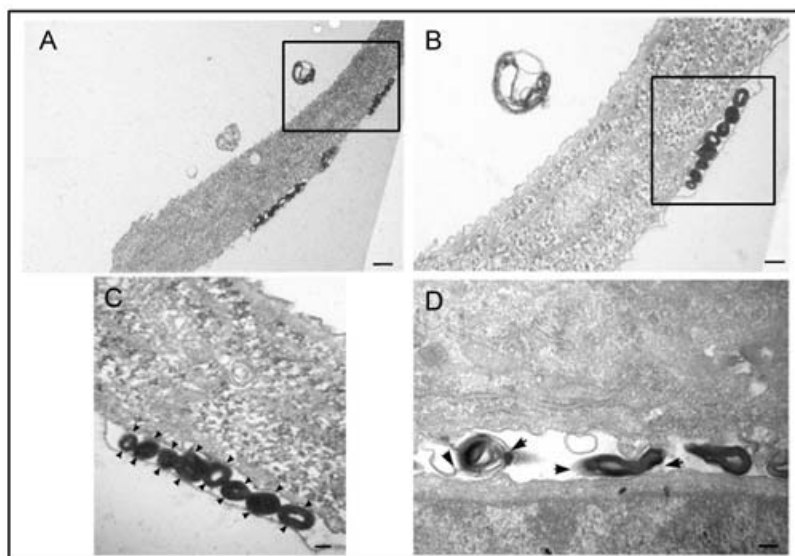


Figura R-30. Micrografías electrónicas procedentes de secciones de 70 nm de grosor y perpendiculares a la base de células MRC-5 infectadas a 16 hpi (1 UFF/célula). (A) Células MRC-5 infectadas a 16 hpi. (B) y (C) Detalle de (A); en (C) se puede observar una membrana exterior rodeando a la estructura altamente contrastada. En (C), la punta de flechas negras indican los puntos que se midieron para calcular la longitud de las estructuras membranosas. (D) Estructuras membranosas entre células situadas en posición apical-basal. Barra en (A) 0,5 μm , en (B) y (D) 0,2 μm y en (C) 100 nm.

2.3. Estudio de los cambios en la membrana plasmática de células MRC-5 infectadas con el VBUN mediante microscopía de fluorescencia.

2.3.1. Búsqueda de estructuras membranosas utilizando la lectina WGA.

Se usó la lectina WGA 594 en células MRC-5 sin permeabilizar para marcar la membrana plasmática, como se ha descrito previamente en células BHK-21. Durante la infección de células MRC-5, se intensificó la señal de WGA y se incrementaron el número de ramificaciones y las prolongaciones de varias micras de longitud (Figura R-31). En los extremos de estas ramificaciones la señal de la lectina se intensificó. Las terminaciones de las prolongaciones visualizadas en las células MRC-5 infectadas fueron más estrechas que las visualizadas en células BHK-21.

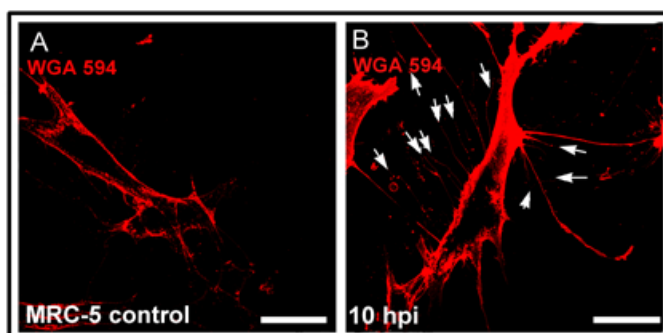


Figura R-31. Células MRC-5 control e infectadas a 10 hpi (1 UFF/célula) sin permeabilizar y tratadas con lectina WGA. WGA 594 (rojo). (A) Células MRC-5 control. (B) Células MRC-5 infectadas. Obsérvese el incremento de prolongaciones en células infectadas, así como el incremento en la intensidad del marcaje de la lectina en la membrana plasmática. Las flechas en (B) indican numerosas prolongaciones emitidas desde la superficie celular. Barras 25 μ m.

2.3.2. Cambios en la distribución de proteínas implicadas con la adhesividad celular.

Se utilizaron anticuerpos específicos para proteínas implicadas en adhesión celular con el objetivo de identificar posibles cambios durante la infección. En la Tabla R-1, se recogen los cambios detectados por inmunofluorescencia a 16-18 hpi y 1 UFF/célula (Figura R-32).

La señal de cortactina se intensificó durante la infección viral en la periferia celular (Figuras R-32-B hasta R-32-D). Durante la infección la señal de vinculina se intensificó en regiones perinucleares, perdiéndose el patrón periférico característico de células MRC-5 control (Figuras R-32-E, R-32-F y R-32-G).

Para el resto de proteínas estudiadas transcurridas 18 hpi, se perdieron los patrones originales de las células control, como se resume en la Tabla R-1.

Tabla R-1. Cambios en la distribución de proteínas relacionadas con la adhesividad celular durante la infección del VBUN en células MRC-5 estudiado por microscopía de fluorescencia.

Proteínas (adhesividad celular)	Señal en células MRC-5 control	Señal en células MRC-5 infectadas a 5 hpi	Señal en células MRC-5 infectadas a 16-18 hpi
Paxilina	Prolongaciones celulares, ondas de membrana, filopodio; señal punteada en regiones perinucleares.	La señal se dispersó por todo el citoplasma celular sin patrón definido.	La señal se dispersó por todo el citoplasma celular sin patrón definido.
Vinculina	Asociada a prolongaciones de membrana, proyecciones celulares y puntos de adhesión focal. La señal recuerda a puntos de nucleación de actina.	Señal similar a la de las células MRC-5 control.	La señal se dispersó por todo el citoplasma celular sin patrón definido.
Cortactina	Señal definida en lamelipodia, ondas de membrana y proyecciones celulares.	Intensificación general de la señal en toda la célula y sobre todo en ondas de membrana y filopodio.	Intensificación de la señal en membrana plasmática y filamentos; algunos filamentos conectaron células infectadas con las no infectadas.
N-Wasp (H-100)	Señal intensa en zonas perinucleares, puntos de adhesión celular. Se visualizan filamentos en prolongaciones celulares y ondas de membrana con señal N-WASP.	Señal similar a la encontrada en células MRC-5 control.	La señal se dispersó por todo el citoplasma celular. Se perdió la señal perinuclear, de filamentos y de puntos de adhesión próximos a la membrana plasmática.
Integrina A4	Prolongaciones celulares, ondas de membrana, filopodio; señal punteada en regiones perinucleares.	Señal similar a la encontrada en células MRC-5 control.	La señal se dispersó por todo el citoplasma celular sin patrón definido.

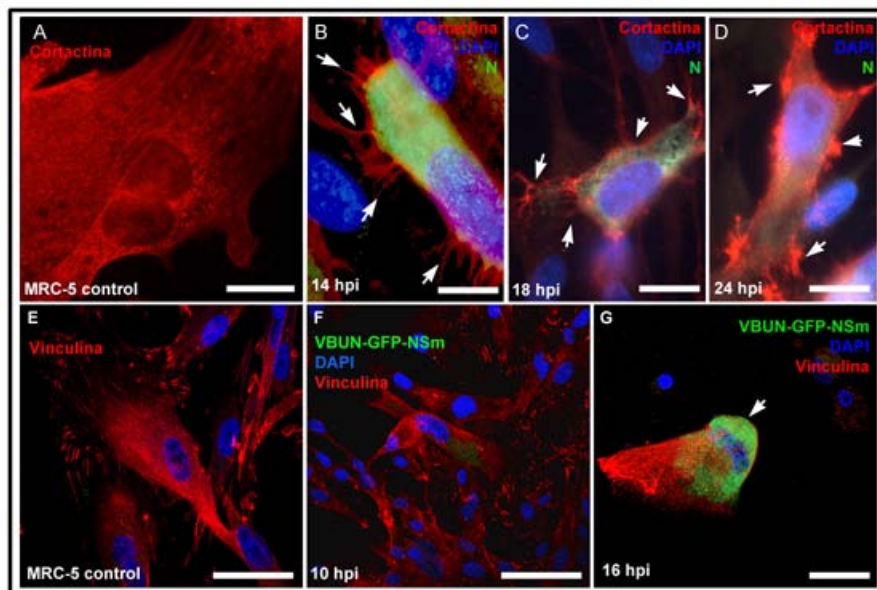


Figura R-32. Distribución de cortactina y vinculina en células MRC-5 control e infectadas con VBUN (1 UFF/célula). En (A) hasta (C) cortactina (rojo), N (verde) y DAPI (azul). (A) Células MRC-5 control. (B) Células MRC-5 infectadas a 14 hpi. (C) Células MRC-5 infectadas a 18 hpi. (D) Células MRC-5 infectadas a 24 hpi; las flechas blancas indican señal de cortactina formando filamentos en el contorno celular y conectando células MRC-5. En (D) hasta (F) vinculina (rojo), VBUN-GFP-NSm (verde) y DAPI (azul). (D) Células MRC-5 control. (E) Células MRC-5 infectadas a 10 h. (F) Células MRC-5 infectadas a 18 horas, las flechas blancas indican células MRC-5 con señal del virus VBUN-GFP-NSm. Barras en (A), (B), (C), (D) y (G) 10 μ m, en (E) y (F) 25 μ m.

2.4. Detección de proteínas del citoesqueleto y de la adhesión celular mediante Western blot.

Se realizaron estudios bioquímicos para estudiar posibles cambios en la expresión de proteínas implicadas con la adhesividad celular y el citoesqueleto en células MRC-5 control e infectadas a 16 hpi (1 UFF/célula), utilizando la actina como control de carga. No se observaron cambios de expresión significativos de las proteínas N-WASP, cortactina, integrina $\beta 5$ e integrina $\alpha 5$ (Figura R-33). Por ello, no parece probable que modificaciones en sus niveles de expresión tengan relación con las señales que dan lugar a las estructuras membranas inducidas por el virus VBUN. A pesar de que los niveles de expresión de cortactina en células MRC-5 infectadas a 16 hpi no variaron con respecto a los niveles en células MRC-5 control, en los experimentos de inmunofluorescencia sí se detectó una intensificación de la señal periférica de la cortactina próxima a la membrana plasmática formando filamentos que conectan células entre sí.

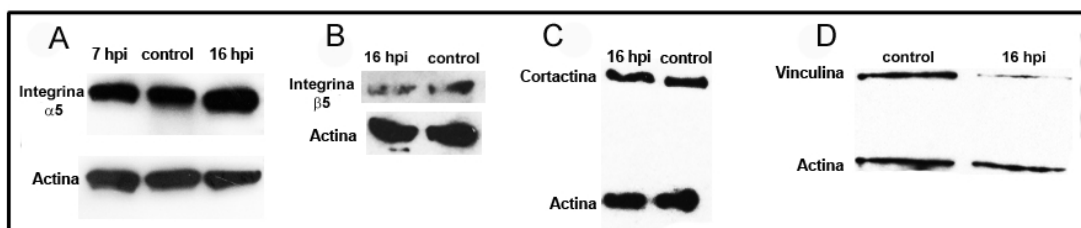


Figura R-33. Niveles de expresión de proteínas relacionadas con la adhesividad celular en células MRC-5 durante la infección viral del VBUN. (A) Estudio de la proteína integrina $\alpha 5$. (B) Estudio de la proteína integrina $\beta 5$. (C) Estudio de la proteína vinculina. (D) Estudio de la proteína cortactina.

3. Resultados de la infección del VBUN en células humanas HEp-2.

La tercera línea celular en la que se estudió la posible existencia de estructuras membranas fueron las células HEp-2, epiteliales de origen humano que crecen formando agregados o “clusters”.

3.1. Caracterización de la infección del virus VBUN en HEp-2.

3.1.1. Titulación del virus VBUN en células HEp-2.

Se crecieron células HEp-2 en placas p-24 hasta alcanzar el 100% de confluencia para titular un stock del VBUN (generado en células BHK-21). No se pudo titular el VBUN en células HEp-2 ni por ensayos de placas de lisis ni por inmunofluorescencia transcurridos 6 dpi. Tampoco se pudo titular sobre las propias células HEp-2 los virus extracelulares e intracelulares procedentes de células HEp-2 infectadas. Sin embargo, sobre células BHK-21, sí se pudieron titular los virus procedentes de células HEp-2. Las placas de lisis producidas por virus VBUN procedentes de células HEp-2 fueron de menor diámetro y más difusas que las producidas por VBUN crecido en células BHK-21. Los resultados quedan recogidos en la Tabla R-2.

A partir de 24 hpi, se alcanzó el título viral máximo en los sobrenadantes de células HEp-2 infectadas (10^5 UFP/ml). En todos los tiempos analizados, el título

viral intracelular fue inferior al título de virus extracelulares, excepto para 8 hpi, en el que no se detectaron virus extracelulares pero sí intracelulares.

Debido a que no fue posible la titulación del VBUN producido en células HEp-2 sobre ellas mismas, no se pudo calcular de forma rigurosa, las UFP/célula del VBUN en células HEp-2. De forma que la infección en células HEp-2, se centró a nivel individual de cada célula y no se pudo estudiar la evolución de la infección de la monocapa en comparación estricta con células BHK-21. La cuantificación de células HEp-2 infectadas a 10 UFP/célula fue similar a la cuantificación de células BHK-21 infectadas a 1 UFP/célula. Por lo que los experimentos de infección de células HEp-2 fueron realizados a 10 UFP/célula, asumiendo que aproximadamente este valor equivalía a 1 UFP/célula para células BHK-21.

Tabla R-2. Título viral procedente de VBUN extracelulares e intracelulares producidos en células HEp-2 y titulados en células BHK-21.

Horas post-infección	Virus extracelulares (UFP/ml)	Virus intracelulares (UFP/ml)
8	No se detectaron placas	3×10^4
14	2×10^5	3×10^4
18	6×10^5	10^4 - 10^5
24	10^5	No se detectaron placas
40	5×10^5	No se detectaron placas

3.1.2. Recuentos de células HEp-2 infectadas utilizando anticuerpos específicos contra VBUN.

El número de células HEp-2 infectadas se estudió a través de recuentos de células marcadas con anti-Gc o con anti-VBUN. Se llevó en paralelo el mismo experimento con células BHK-21 infectadas a 1 UFP/célula. Prácticamente el 100% de células BHK-21 presentó marca de Gc transcurridas 10 hpi. Sin embargo, en células HEp-2 infectadas a 10 hpi, sólo el 13-15% presentaron señal con anti-Gc, presentando un patrón punteado en regiones próximas al núcleo (Figura R-34-A). Se obtuvieron los mismos porcentajes de células HEp-2 infectadas marcadas con anti-VBUN (Figura R-34-B).

Transcurridas 48 hpi, el porcentaje de células HEp-2 infectadas con VBUN fue del 100%. Los patrones de fluorescencia de ambos anticuerpos fueron similares a los conocidos para células BHK-21 y MRC-5.

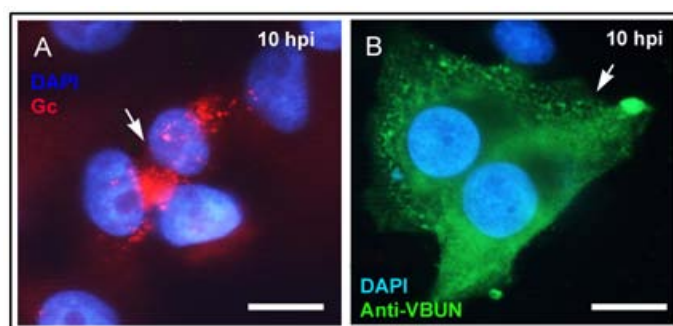


Figura R-34. Estudio en células HEp-2 infectadas con el VBUN utilizando un anticuerpo contra la glicoproteína Gc y el antisuero anti-VBUN. (A) y (B), Células HEp-2 infectadas a 10 hpi. En (A) Gc (rojo) y DAPI (azul). La marca de anti-Gc es punteada. En (B) Anti-VBUN (verde) y DAPI (azul). La distribución de anti-VBUN es reticulada. Barras 10 μ m.

3.2. Caracterización ultraestructural de la infección del VBUN en células HEp-2 mediante MET y búsqueda de estructuras membranas.

Se estudió la posible existencia de estructuras membranas en zonas basales de células HEp-2 mediante análisis de cortes seriados y orientados para MET. Se crecieron células HEp-2 control e infectadas sobre Thermanox[®] siguiendo el protocolo habitual de inclusión en Epoxi-resina. En las regiones basales de las células HEp-2 control se detectaron restos de prolongaciones celulares tipo filopodio (Figura R-35-B), pero no se observaron estructuras membranas “gecko-like”. Se detectaron pequeñas acumulaciones membranas, pero sin la organización característica en multilaminas de las estructuras membranas objeto de estudio.

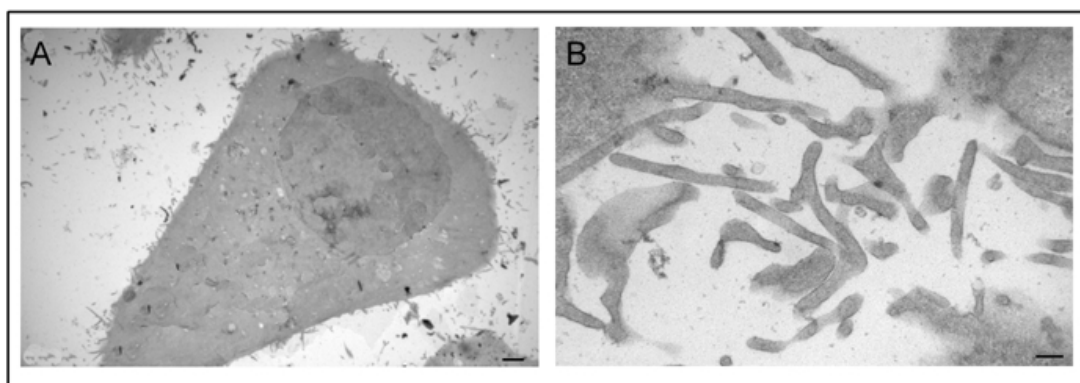


Figura R-35. Estudio de la ultraestructura de células HEp-2 control por MET. Cortes de 75 nm de grosor. (A) Micrografía electrónica de una célula HEp-2 control a baja magnificación, de morfología triangular y núcleo grande situado en el extremo celular. (B) Micrografía electrónica de regiones basales de células HEp-2 control, mostrando los filopodios a mayor magnificación. Barra en (A) 2 μ m y en (B) 200 nm.

Ante de 30 hpi los cambios morfológicos en las células HEp-2 fueron mínimos. En células HEp-2 infectadas con VBUN a 30 hpi, se observaron cambios significativos en la morfología celular: se incrementó el grado de vacuolización en el citoplasma de células HEp-2 (Figura R-36-A), incluso detectable por microscopía de fluorescencia (Figura R-36-B). A mayor magnificación, se detectaron vesículas por todo el citoplasma (Figura R-36-C). Algunas de las vesículas con doble membrana recordaron procesos de autofagia (Figura R-36-D). La membrana nuclear presentó interdigitaciones (Figura R-36-E) y el aparato de Golgi se detectó dilatado y fragmentado (Figura R-36-F). Las mitocondrias se ensancharon y aparecieron levemente contrastadas próximas a las vesículas intracelulares, de doble membrana (Figura R-36-G). En general, se incrementó el número de estructuras similares a lisosomas (Figura R3-36-H). No se detectaron partículas virales madurando en el interior de cisternas del Golgi. El RER se retiró a regiones periféricas rodeando las vesículas intracitoplasmáticas.

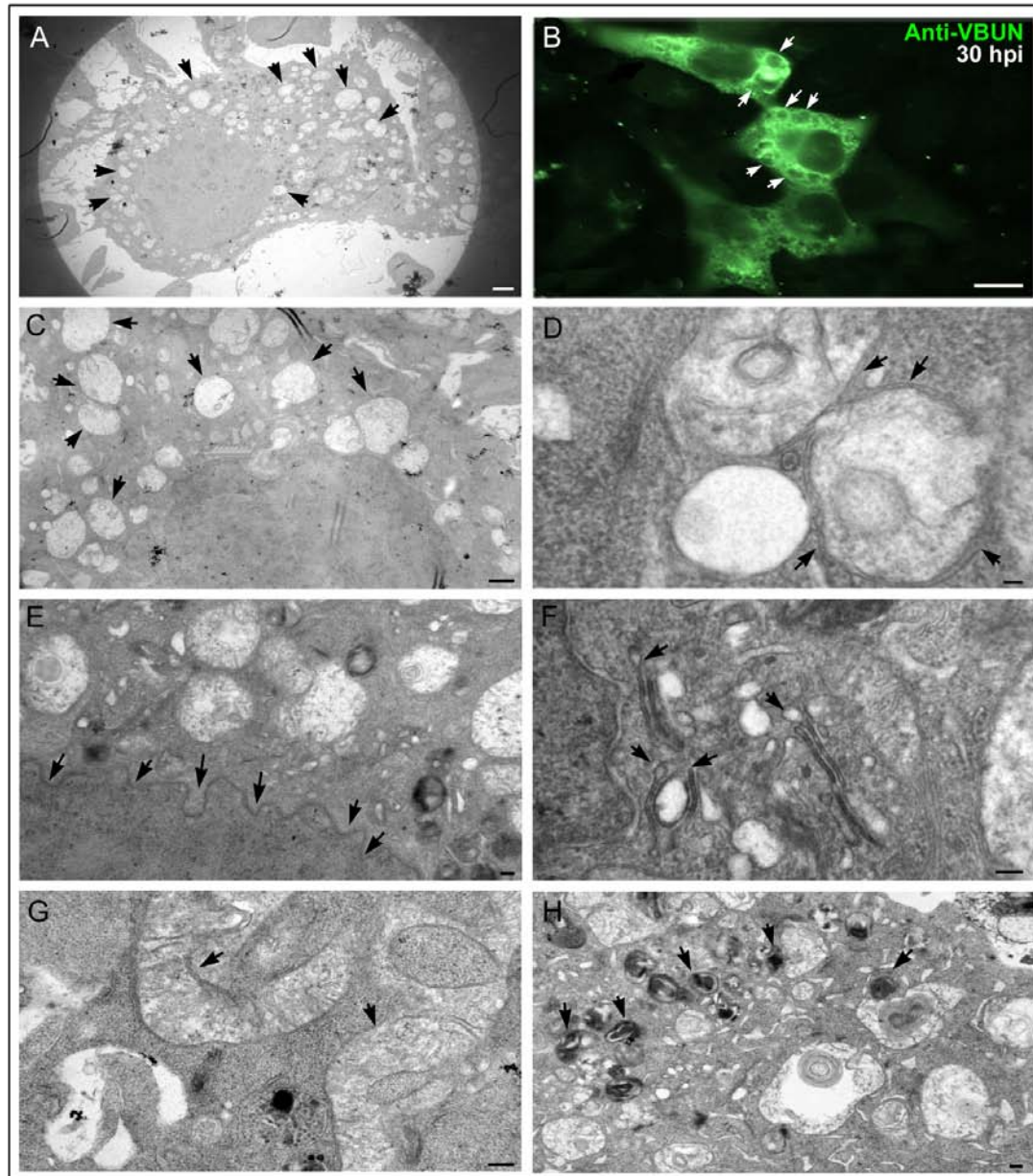


Figura R-36. Estudio de la ultraestructura de células HEp-2 infectadas con VBUN. Cortes de 75 nm de grosor. (A) Micrografía electrónica de una sección de una célula HEp-2 infectada con VBUN, aproximadamente a 1 μ m de altura desde la base celular; las flechas indican el elevado grado de vacuolización. (B) Células HEp-2 infectadas a 30 hpi; señal de fluorescencia observada con el antisuero anti-VBUN; las flechas blancas indican las oquedades que se observan en MET. (C) Detalle del citoplasma altamente vacuolizado de (A), las flechas negras indican vacuolas. (D) Se observa a mayor magnificación las vacuolas intracitoplasmáticas visualizadas en (A); las flechas negras indican vesículas de doble membrana. (E) Detalle de la membrana nuclear; las flechas negras indican las invaginaciones a una altura de 6,7-10 μ m desde la base celular. (F) Detalle de las cisternas del aparato de Golgi (flechas negras) a una altura de 6,7-10 μ m desde la base celular. (G) Mitocondrias (flechas negras). (H) Estado del citoplasma celular a 8,3-11,11 μ m de altura desde la base celular; se pueden observar numerosas vesículas y posibles lisosomas (flechas negras). Barra en (A) 2 μ m, en (B) 10 μ m y en (C) 1 μ m, en (D) 50 nm y en (E), (F), (G) y (H) 200 nm.

Se estudió en detalle la región basal de células HEp-2 infectadas con el VBUN. Se observaron restos de membranas próximas a la membrana plasmática (Figura R-37), pero sin formar estructuras membranosas multilamellares

características. No se detectó liberación de partículas virales en las regiones basales de células HEp-2 infectadas.

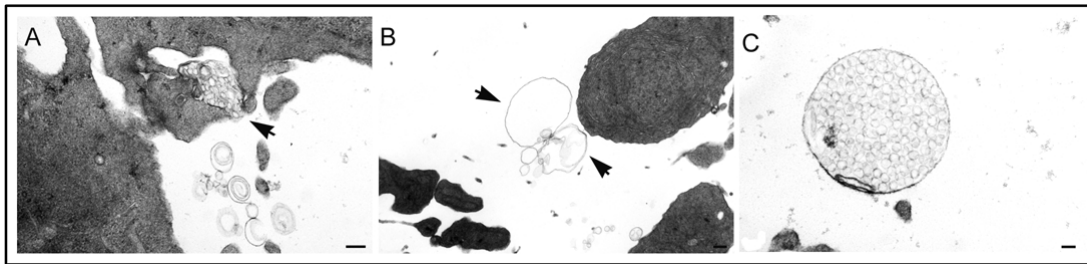


Figura R-37. Estudio por MET de regiones basales en monocapas de células HEp-2 infectadas con VBUN. (A), (B) y (C) Secciones ultrafinas de 75 nm de grosor estudiadas por MET, procedentes de células HEp-2 infectadas a 8 hpi. Las flechas indican restos celulares. (A) A 0,28 μm de altura desde la base celular. (B) Otra región, a 0,28 μm de altura desde la base celular. (C) A 2-4 μm de altura desde la base celular. Las flechas negras indican restos de membranas situadas entre células HEp-2. Barra en (A) 200 nm y en (B) y (C) 100 nm.

En células HEp-2 infectadas, se estudiaron también cortes perpendiculares a la base celular para detectar posibles estructuras membranosas en contacto con la superficie del sustrato y comprobar si los virus se liberaban por zonas basales. En estas regiones se observaron numerosas vesículas y mitocondrias próximas a cisternas del RER (Figura R-38-A). En el entorno extracelular, se detectaron restos de filopodios y ausencia total de estructuras membranosas características. No se detectó liberación de virus en regiones basales. En el interior del citoplasma se encontraron escasas vesículas que recordaron por tamaño y forma a virus VBUN inmaduros (Figura R-38-B). En zonas basales próximas al soporte con el sustrato, se observaron puntos de apoyo (Figuras R-38-C y R-38-D) que contienen numerosas vesículas, pero no lamelas membranosas.

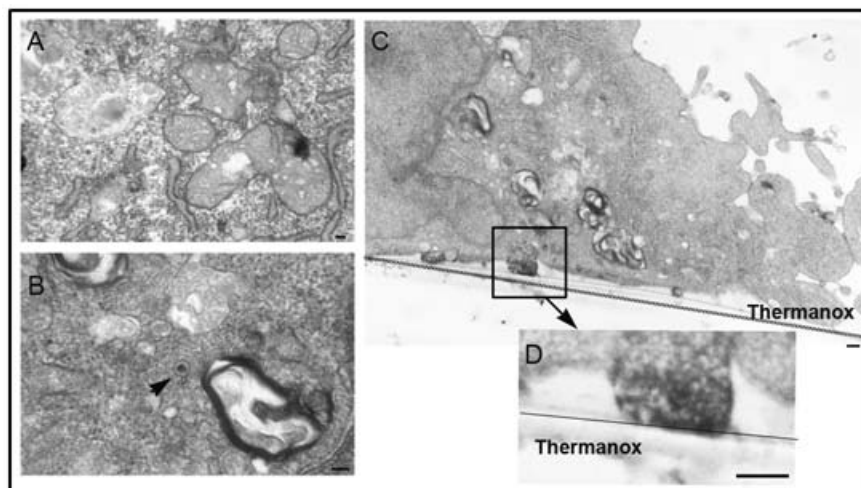


Figura R-38. Micrografías electrónicas de secciones ultrafinas de 75 nm de grosor cortadas perpendicularmente a la base de células HEp-2 infectadas a 48 hpi con VBUN. (A) Micrografía electrónica de una sección ultrafina del citoplasma de una célula HEp-2 infectada; se observan mitocondrias y sáculos de RER en regiones basales. (B) Otra zona basal de otra célula HEp-2 infectada; la flecha negra indica un posible virus VBUN intracelular próximo a vesículas altamente contrastadas. (C) Micrografía electrónica procedente de un corte perpendicular de una célula HEp-2 infectada a menor magnificación. El cuadrado negro que se muestra, indica la región basal en contacto con la superficie del sustrato, formada por vesículas intracelulares ampliada en (D). Barra en (A) y (B) 100 nm y en (C) y (D) 200 nm.

Los cortes perpendiculares de células HEp-2 infectadas confirmaron la ausencia de estructuras membranosas multilamelares en regiones basales y tampoco se detectó la liberación de virus en estas zonas. Los puntos de apoyo de las células HEp-2 estuvieron formados por pequeñas vesículas, similares a podosomas. Los virus intracelulares fueron escasos y no se detectaron en el interior de las cisternas del aparato de Golgi.

3.2.1. Desarrollo de protocolos de microscopía correlativa e inclusión en resina LR-WhiteTM y el virus recombinante VBUN-GFP-NSm.

La utilización del virus recombinante VBUN-GFP-NSm (rBUNM-NSm-EGFP) permitió distinguir células infectadas sin necesidad de permeabilizarlas. Transcurridas 16 hpi, una gran parte de la monocapa no presentó fluorescencia, aproximadamente el 60%. La señal viral de GFP-NSm, se concentró en la región perinuclear, mientras que el patrón de la lectina WGA marcó el contorno celular (Figuras R-39-A y R-39-B). El contorno de las células infectadas fue vesiculado.

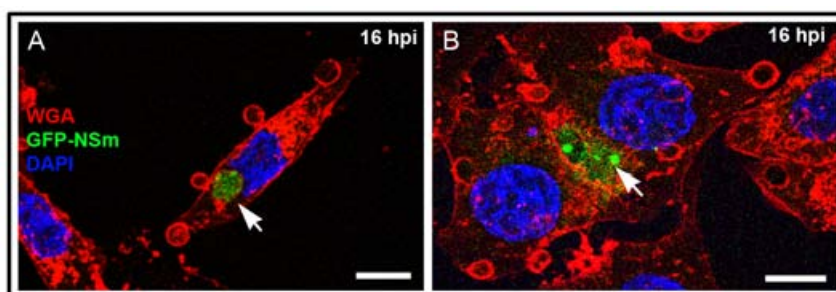


Figura R-39. Estudio del contorno celular en células HEp-2 infectadas y sin permeabilizar a 16 hpi (10 UFP/célula) con el virus rBUNM-NSm-EGFP usando la lectina WGA. WGA (rojo), DAPI (azul) y VBUN-GFP-NSm (verde). Las flechas blancas indican el lugar de la factoría viral situada un lado del núcleo. La señal WGA 594 delimita la membrana plasmática. Se observan restos celulares marcados con WGA próximos a la membrana plasmática en forma de “burbuja”. Barras 10 μ m.

En células HEp-2 infectadas con el virus rBUNM-NSm-EGFP no se detectaron estructuras membranosas similares a las encontradas en células infectadas con VBUN BHK-21 y MRC-5 y marcadas con la sonda WGA.

Se desarrollaron protocolos de microscopía correlativa dirigidos al estudio de células HEp-2 infectadas para intentar localizar la zona de ensamblaje y liberación del VBUN en esta línea celular. Se utilizó el virus recombinante VBUN-GFP-NSm que progresa más lentamente que el “wild type”. Se crecieron células HEp-2 en portaobjetos con cuadrícula y se infectaron durante 30 horas a 10 UFP/célula (Figura R-40-A). Tras realizar varios lavados, se seleccionaron 10 células para ser incluidas en resina LR-WhiteTM (Figura R-40-B). En las células HEp-2 seleccionadas, la señal de fluorescencia fue detectada predominantemente en regiones medias-apicales, situándose a 15-20 μ m de altura desde la base celular (Figura R-40-C). Estas células se procesaron para la inclusión y obtención de cortes ultrafinos seriados para su posterior estudio por MET. No se detectaron virus liberados en regiones basales. A partir de 11 μ m de altura (Figura R-40-F y R-40-H), se detectaron los nuevos VBUN en grandes vesículas citoplasmáticas. Se detectaron virus siendo liberados en zonas apicales, a 29 μ m de altura desde la base celular (Figura R-40-G y R-40-I). Se hicieron inmunomarcajes con el anticuerpo específico para la proteína N, y un anticuerpo conjugado con oro coloidal detectándose señal en los virus que se liberan en regiones medias-apicales como se observa por MET (Figura R-40-I).

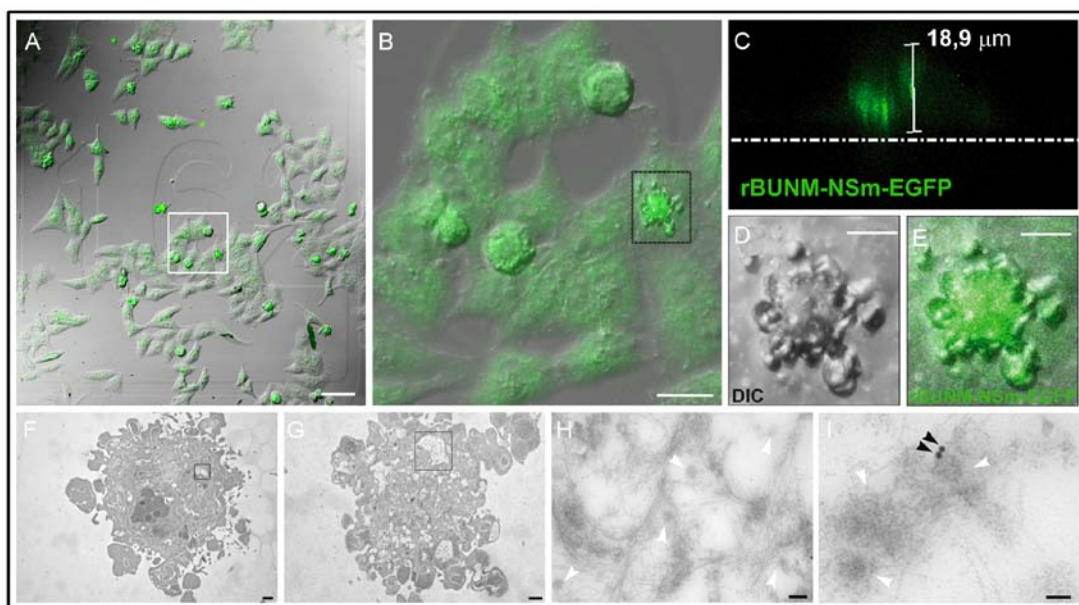


Figura R-40. Microscopía correlativa en células HEp-2 infectadas a 30 hpi con el virus rBUNM-NSm-EGFP. (A) Cuadrícula numerada con células HEp-2 infectadas con VBUN-GFP-NSm. (B) Región ampliada de (A), selección de célula a estudiar por MET. (C) Proyección lateral de la señal de GFP-NSm de la célula seleccionada en (B). La fluorescencia alcanzó 18,9 μm de altura desde la base celular. (D) Célula HEp-2 seleccionada, proyección DIC. (E) Célula HEp-2 seleccionada, proyección GFP-NSm. (F) Micrografía electrónica de la célula HEp-2 seleccionada en (B) a 11 μm de altura desde la base celular. (G) Micrografía electrónica de la célula HEp-2 seleccionada en (B) a 29 μm de altura desde la base celular. (H) Detalle de vacuola citoplasmática procedente de (F) en el que se observan partículas virales (punta de flechas blancas). (I) Detalle de vacuola citoplasmática procedente de (G) en el que se observan partículas virales (punta de flechas blancas) y señal de N (punta de flechas negras) Barras en (A) y (B) 2 μm , en (D) y (E) 10 μm , en (F) y (G) 1 μm , en (H) 100 nm y en (I) 50 nm.

Dentro de las células, la señal de N detectada por inmunomarcajes, apareció próxima a mitocondrias (Figura R-41-A). A 4-6 μm de altura desde la base celular, se encontró la máxima concentración de señal de N en regiones perinucleares (Figura R-41-B). La señal de ARN de doble hebra fue escasa por todo el citoplasma, sin poder asociar un patrón u orgánulo celular (resultados no mostrados). En regiones apicales se detectó la liberación de nuevas partículas virales que se marcaron con anti-N (Figura R-41-C).

El estudio de la infección viral por técnicas de microscopía correlativa e inmunomarcajes de la proteína N, reveló que la liberación de nuevos virus ocurre a partir de 11 μm de altura desde la base de las células HEp-2, entre restos celulares y filamentos, coincidiendo con la máxima intensidad de fluorescencia de GFP-NSm. Durante la infección, las células HEp-2 se deformaron y se hincharon, alcanzando alturas superiores a 29 μm de altura desde la base celular. Los núcleos se situaron en un extremo de la célula, mientras que los orgánulos celulares se encontraron altamente fragmentados. No se detectó maduración de los virus intracelulares en cisternas de Golgi. La señal de N apareció dispersa por todo el citoplasma hasta llegar a los cortes más apicales (25-30 μm), detectándose en regiones próximas a la membrana plasmática.

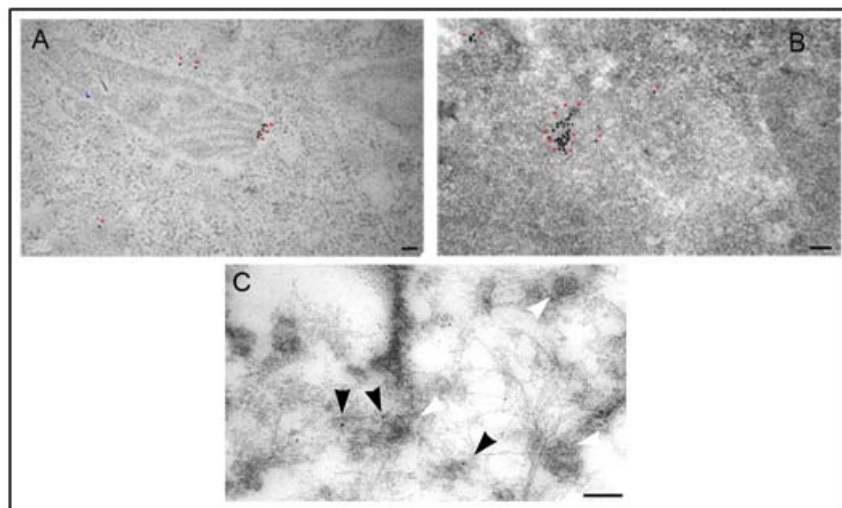


Figura R-41. Detección de la nucleocápsida viral, N, en células HEp-2 infectadas a 30 hpi. (A) Micrografía electrónica procedente de un corte a 0,070 μm de altura desde la base celular; la señal de N (asteriscos rojos) aparece asociada a mitocondrias. (B) Micrografía electrónica de otro corte a 4,061-6,695 μm de altura desde la base celular; se concentra la señal de N en el citoplasma celular. (C) Micrografía electrónica de partículas virales liberadas a partir de 11 μm de altura de la base celular (flechas blancas); la flecha negra señala marca de N. Barras 100 nm.

3.2.2. Estudio por MET y microscopía de fluorescencia de células HEp-2 infectadas con VBUN y fijadas sin retirar el medio de cultivo.

Se fijaron las células HEp-2 infectadas a 30 hpi con el medio de cultivo para preservar posibles estructuras membranosas y favorecer el estudio de la liberación de los nuevos VBUN. Se realizaron cortes seriados desde la base celular hasta aproximadamente, 30 μm de altura desde la base celular. La liberación de los virus se visualizó al fijar el medio de cultivo, principalmente en regiones medias-apicales, a partir de 4-5 μm de altura hasta más de 25 μm desde la base celular (Figura R-42). Próxima a la membrana plasmática, se observaron restos de membranas pero sin formar ningún tipo de estructura multilamelar organizada. En el interior de estas membranas a menudo se encontraron partículas virales del VBUN (Figura R-42-D).

Los nuevos virus se detectaron asociados a restos celulares y de membranas próximos a la membrana plasmática en regiones medias-apicales de las células HEp-2, pero no en regiones basales.

De la misma manera, se fijaron células HEp-2 infectadas con el medio de cultivo para estudiar por inmunofluorescencia la señal de la glicoproteína Gc y del anticuerpo anti-VBUN (Figura R-43) e intentar detectar las partículas virales recién liberadas. La señal del anticuerpo α -Gc se detectó sobre las células, con patrón punteado en regiones medias-apicales. La señal del anti-VBUN mostró un patrón reticulado, próximo a la señal de Gc. Este tipo de estudios demostraron que la señal de la glicoproteína (al no usar agentes de permeabilización, marcó virus extracelulares) se concentró en regiones medias-apicales de las células HEp-2 infectadas y próxima a la membrana plasmática. Estos resultados concuerdan con los estudios de cortes seriados estudiados por MET, la liberación de VBUN ocurre en regiones medias-apicales próximas a la membrana plasmática de las células HEp-2.

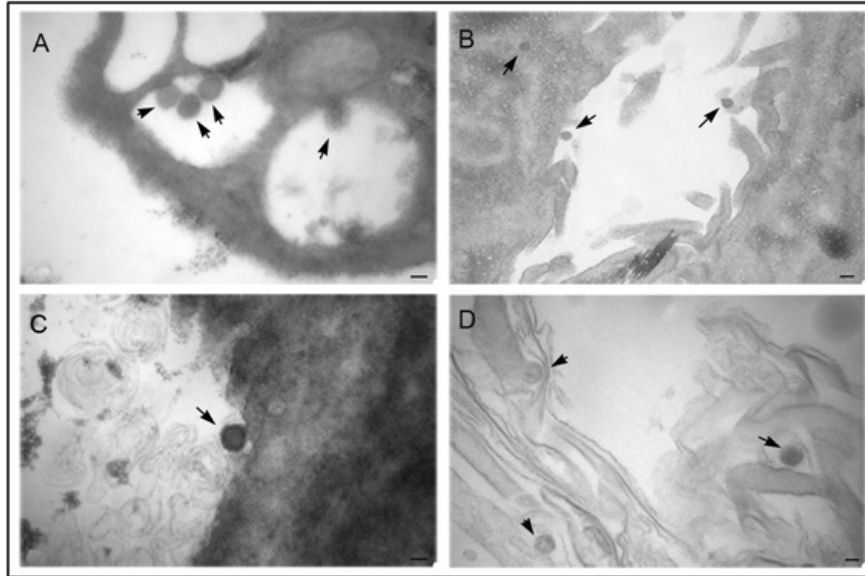


Figura R-42. Micrografías electrónicas de células HEp-2 infectadas a 30 hpi con VBUN y fijadas con el medio de cultivo. (A) Micrografía electrónica de un corte a 4,060 μm de altura desde la base celular de una célula HEp-2 infectada; los nuevos virus aparecen adheridos a la membrana plasmática (flechas negras). (B) Micrografía electrónica de una sección más apical de la misma célula de (A), a 6,79 μm de altura desde la base celular; los nuevos virus (flechas negras) aparecieron en contacto con la membrana plasmática. (C) Micrografía electrónica de otra región celular más apical de (A), a 10-11,990 μm de altura desde la base celular; se pueden observar restos celulares próximos al virus (flecha negra). (D) Micrografía electrónica de un corte a 11,990-13,600 μm de altura desde la base celular. Se observan las nuevas partículas virales asociadas a restos celulares (flechas negras). Barras en (A), (C) y (D) 50 nm y en (B) 100 nm.

La fijación de las células HEp-2 infectadas sin retirar el medio de cultivo favoreció la detección de partículas virales extracelulares marcadas con Gc ya que quedaron retenidas en la superficie celular.

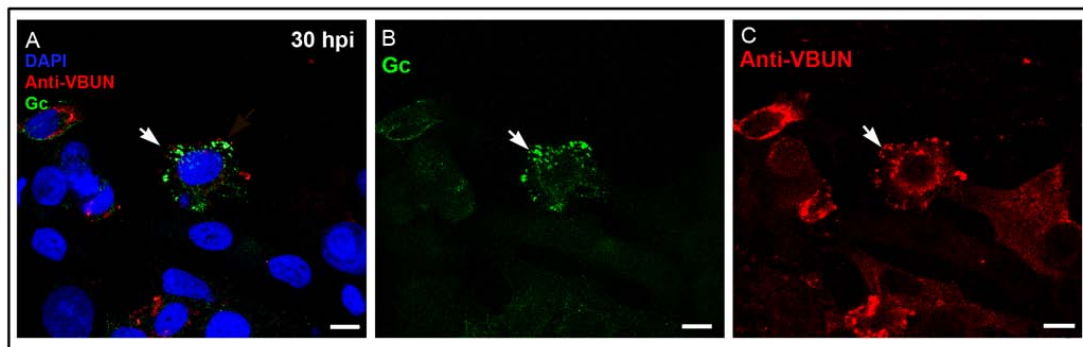


Figura R-43. Fijación de células HEp-2 infectadas a 30 horas (10 UFP/célula) con el medio de cultivo. Gc (verde), Anti-VBUN (rojo), DAPI (azul). (A) Suma de proyecciones de Gc, DAPI y anti-VBUN. (B) Proyección Gc. (C) Proyección anti-VBUN. Las flechas blancas indican la señal de anti-Gc y anti-VBUN. Barras 10 μm .

3.3. Estudio por microscopía óptica de fluorescencia del contorno celular de células HEp-2 utilizando la sonda WGA.

El estudio por microscopía electrónica de células HEp-2 infectadas con el VBUN reveló importantes diferencias en cuanto al ensamblaje y la liberación de nuevos virus en comparación con lo descrito para células BHK-21 y MRC-5 infectadas. No se observó maduración de virus en cisternas del aparato de Golgi, ni liberación de virus en regiones basales, ni tampoco estructuras membranosas en las regiones basales.

3.1.2. Marcadores de la región *cis-media* del aparato de Golgi y Gc

Para intentar localizar el sitio de ensamblaje del VBUN en células HEp-2, se utilizó el anticuerpo contra la proteína viral Gc, marcador de morfogénesis, conjuntamente con anticuerpos marcadores de diversos orgánulos celulares mediante ensayos de inmunofluorescencia. En células HEp-2 control, el patrón de Gigantina, marcador de la región *cis-media* Golgi, se situó en un extremo celular con patrón punteado. En células HEp-2 infectadas a 8 hpi, la señal de Gc se detectó en regiones medias-apicales, sin colocalizar con la señal de Gigantina (Figura R-44).

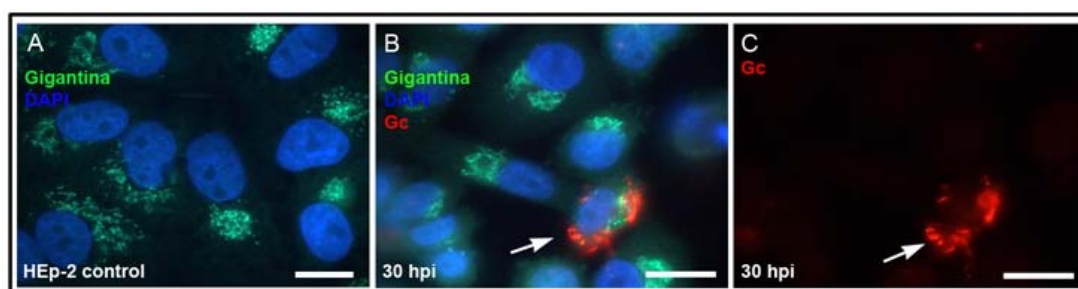


Figura R-44. Distribución de la señal del marcador de región *cis-media* Golgi, Gigantina, y la glicoproteína Gc en células HEp-2 control e infectadas 30 hpi. Gigantina (verde), Gc (rojo), DAPI (azul). (A) Células HEp-2 control. (B) Células HEp-2 infectadas a 30 hpi, las flechas blancas indican señal de Gc (C) Proyección de la señal de glicoproteína Gc. Barras de 10 μ m.

Se quiso comprobar si otros marcadores de morfogénesis viral colocalizaban con marcadores de la región *cis-media* del aparato de Golgi. Se infectaron células HEp-2 con el virus quimera VBUN-GFP-NSm (rBUNM-NSm-EGFP) a 8 hpi. Además se estudió la distribución de las mitocondrias durante la infección viral utilizando la sonda Mitotracker[®] (Figura R-45). En células HEp-2 control, la señal de Gigantina apareció en regiones perinucleares (Figura R-45-A) y la señal de mitocondrias se distribuyó homogéneamente por todo el citoplasma (Figura R-45-A1). Transcurridas 8 hpi, se detectó una distribución similar entre las señales de Gigantina y el Mitotracker[®] (Figura R-45-B y R-45-B1). Sin embargo, no se detectó colocalización entre la señal del VBUN-GFP-NSm y Gigantina (Figura R-45-B). Durante la infección del VBUN en células HEp-2, se observó por tanto, reclutamiento de mitocondrias a regiones perinucleares (Figura R-45-B1), pero el ensamblaje del virus no se localizó en el aparato de Golgi a diferencia de lo descrito para células BHK-21 y MRC-5.

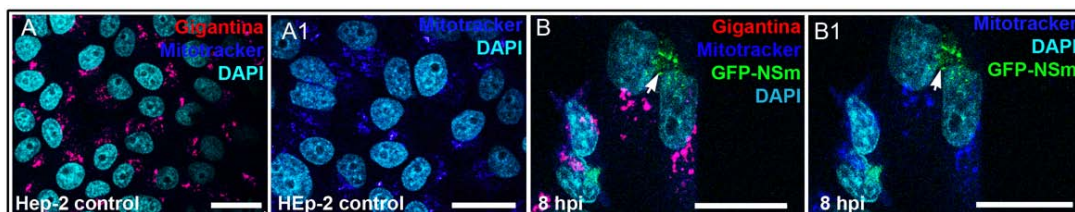


Figura R-45. Estudio por inmunofluorescencia en células HEP-2 infectadas a 8 hpi de la distribución del marcador de región *cis-media* Golgi (Gigantina), mitocondrias (Mitotracker®) y el virus rBUNM-NSm-EGFP. Mitotracker® (azul), Gigantina (rojo), GFP-NSm (verde) y DAPI (Cian). (A) Células HEP-2 control. (A1) Células HEP-2 control, proyección de la señal de mitocondrias y DAPI. (B) Células HEP-2 infectadas con VBUN-GFP-NSm a 8 horas; la flecha blanca indica señal de GFP-NSm. (B1) Células HEP-2 infectadas a 8 hpi, proyecciones de la señal de mitocondrias, DAPI y GFP-NSm. Las proyecciones de Mitotracker® y de Gigantina mostraron una distribución similar al estudiar los planos confocales; sin embargo, no existió una colocalización total. Tampoco se observó colocalización entre la señal de VBUN-GFP-NSm y el marcador de *cis-media* Golgi, Gigantina. Barras 25 µm.

La falta de colocalización en células HEP-2 infectadas con VBUN entre marcadores de la región *cis-media* Golgi y los marcadores virales estudiados, Gc y el virus quimera VBUN-GFP-NSm, pudo deberse a la fragmentación y deterioro de los cisternas de Golgi y endomembranas en general, que se produce durante la infección del VBUN en células HEP-2.

3.1.3. Estudio de autofagosomas usando la sonda MDC.

Las células HEP-2 infectadas con VBUN mostraron una alta vacuolización tanto en los resultados obtenidos por MET, como por inmunofluorescencia. En cortes de microscopía electrónica se observaron vesículas con doble membrana similares a autofagosomas. Se estudió en detalle la distribución de los autofagosomas durante la infección viral, utilizando la sonda monodensilcadaverina (MDC) con el objetivo de comprobar su posible relación con el sitio de ensamblaje y maduración del virus. Resultados no mostrados con tratamientos con BrUr, no se detectó colocalización con la señal de Gigantina. La sonda MDC es un marcador específico de autofagosomas cuando se añade en células vivas (Biederbick y cols., 1995) siguiendo el protocolo de Jackson y cols., 2005. En células control se observó señal de MDC alrededor de los núcleos marcando vesículas de intensidad variable. En algunas células infectadas, la señal se intensificó en las vesículas intracelulares de mayor tamaño próximas al núcleo (Figuras R-46-A y R-46-B).

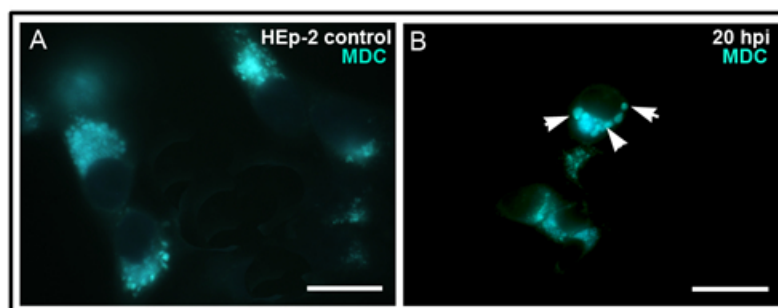


Figura R-46. Estudio en células HEP-2 control e infectadas con VBUN y tratadas durante 1 hora MDC (10 µM). MDC (turquesa). (A) Células HEP-2 control. (B) Células HEP-2 infectadas a 20 hpi; las flechas blancas indican vacuolas intracelulares perinucleares de mayor tamaño que en células sin infectar. Barras 10 µm.

La utilización de la sonda MDC es incompatible con la permeabilización para ensayos de inmunofluorescencia con anticuerpos. Por esta razón, se estudió la distribución de la sonda MDC en las células infectadas con el virus recombinante, VBUN-GFP-NSm. Se infectaron células HEp-2 durante 8, 24 y 30 hpi y se comprobó (por microscopía de fluorescencia primero y después por microscopía confocal) que, la señal de MDC colocalizó con la señal de fluorescencia de GFP-NSm (Figura R-47).

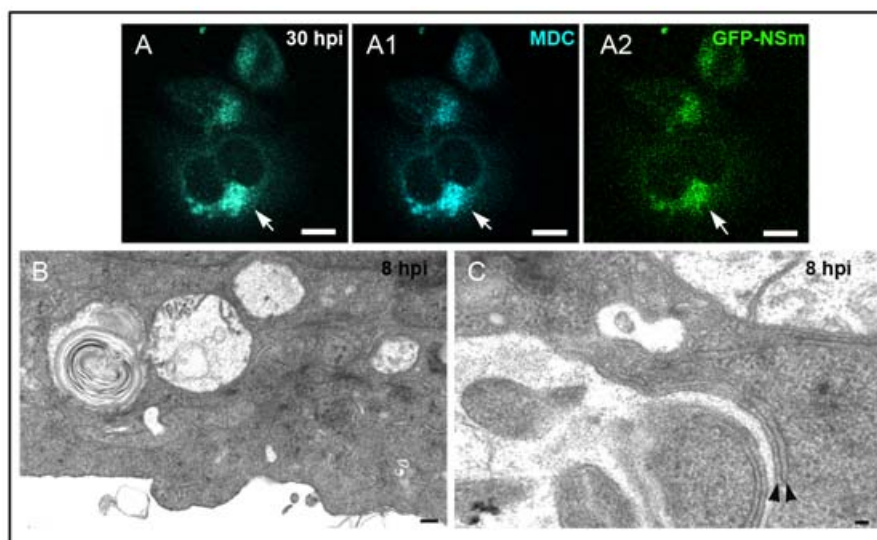


Figura R-47. Distribución de la sonda MDC en células HEp-2 infectadas con VBUN-GFP-NSm a 30 hpi y micrografías electrónicas procedentes de células HEp-2 infectadas con el VBUN 8 hpi. (A) Proyección total de la señal de GFP-NSm y MDC. (A1) Proyección de la señal de MDC. (A2) Proyección GFP-NSm. Las flechas blancas indican las regiones que mostraron colocalización en los planos confocales. (B) Micrografía electrónica del citoplasma de una célula HEp-2 infectada a 8 hpi, a 0,5 μm de altura desde la base celular. (C) Detalle del citoplasma celular de otra célula HEp-2 a 0,35 μm de altura desde la base celular; las flechas negras indican la doble membrana de un posible autofagosoma. Barra en (A), (A1) y (A2) 10 μm , en (B) 200 nm y en (C) 50 nm.

En células HEp-2 infectadas se estudió el efecto de la inhibición de los autofagosomas con la droga 3-Metil-Adenina, 3-MeA (10 mM) en la progresión de la infección con virus quimera VBUN-GFP-NSm. Se comprobó el efecto de la droga añadida durante 1 hora y repetidamente cada dos horas durante el transcurso de la infección (para mantener constante la inhibición de los autofagosomas, debido a que las células HEp-2 degradan la droga cada dos horas). Se comparó el número de células HEp-2 con señal de GFP-NSm obtenidas en cada ensayo, con el número de células HEp-2 con señal en ausencia de la droga. Los recuentos demostraron un discreto descenso de la señal de VBUN-GFP-NSm en células tratadas cada dos horas con 3-MeA. Para la detección de autofagosomas, también se utilizó un anticuerpo específico contra la glicoproteína transmembrana de autofagosomas LC3. La isoforma LC3 I fue detectada mediante inmunofluorescencia en células HEp-2 control, cuyo patrón fue punteado y uniforme por toda la célula. Durante la infección no se detectó colocalización entre LC3 y la señal de fluorescencia de GFP-NSm, pero sí una localización próxima al estudiar planos confocales. La señal de GFP-NSm se detectó en planos medios-apicales de las células HEp-2 infectadas. En la Figura R-48, se recogen y el recuento de células HEp-2 infectadas en ausencia y presencia de la 3MeA.

Estos resultados demostraron que en los autofagosomas no se produce la replicación, ni el ensamblaje y ni la morfogénesis viral en células HEP-2 infectadas, ya que la infección progresa en presencia de la 3-MeA. El incremento en la vacuolización y posiblemente del número de autofagosomas en células HEP-2 infectadas pudo ser un efecto de la citotoxicidad producida por la infección del VBUN.

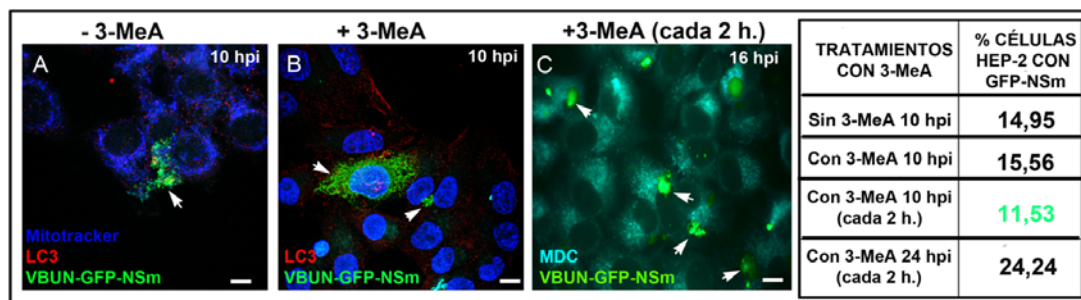


Figura R-48. Tratamiento con 3 Metil-Adenina (10 mM) en células HEP-2 infectadas con el virus rBUNM-NSm-EGFP. En (A) y (B) Mitotracker[®] (azul), VBUN-GFP-NSm (verde) y LC3 (rojo). En (C), MDC (turquesa) y VBUN-GFP-NSm (verde). (A) Células HEP-2 infectadas a 10 hpi sin añadir droga. (B) Células HEP-2 infectadas a 10 hpi tratadas con 10 mM de 3-MeA. (C) Células HEP-2 infectadas a 16 hpi tratadas con 3MeA cada 2 horas. Barras 10 μ m.

- VBUN-GFP-NSm, Lysotracker[®], Lamp-1 y CD63.

Se estudió la posible relación del VBUN con componentes del sistema lisosomal. Se infectaron células HEP-2 durante 30 hpi. En células control la señal de Lysotracker[®] marcó vesículas por todo el citoplasma. Mientras en células HEP-2 infetadas la señal de Lysotracker[®] y GFP-NSm se localizó en regiones perinucleares, pero sin existir colocalización entre las dos señales (resultados no mostrados). Para entender mejor si el sistema lisosomal podía estar relacionado con el ensamblaje viral, se estudió la relación de la proteína Lamp-1, específica de lisosomas y la señal de VBUN-GFP-NSm. La distribución de Lamp-1 en células HEP-2 control marcó vesículas por todo el citoplasma. Durante la infección, se intensificó esta señal en regiones perinucleares pero no se detectó colocalización entre Lamp-1 y GFP-NSm. La señal de GFP-NSm se detectó en regiones perinucleares y en regiones medias-apicales. Se estudió en detalle la distribución del marcador de cuerpos vesiculares y lisosomas tardíos, CD63 con la señal de la glicoproteína Gc. En células HEP-2 control, existió colocalización entre Lamp-1 y CD63. Transcurridas 30 hpi, las señales de Lamp-1 y CD63 se retiraron de regiones periféricas y concentrándose en regiones próximas al núcleo (Figura R-49); sin embargo, no se detectó colocalización con la señal de Gc. Estos resultados demostraron que, la morfogénesis y el ensamblaje viral en células HEP-2, no se produce en membranas derivadas de cuerpos multivesiculares (Figura R-49).

En resumen, en las células HEP-2 infectadas con el VBUN, todos los estudios de colocalización entre marcadores virales y marcadores celulares, (región *cis-media* y *trans* Golgi, mitocondrias, RER -resultados no mostrados-, autofagosomas y lisosomas) han sido negativos. Tampoco el estudio de células HEP-2 infectadas por cortes ultrafinos de MET aportó información útil sobre el sitio de ensamblaje del VBUN en estas células. Estos resultados pueden deberse al grado de deterioro de las membranas de los orgánulos celulares durante la infección del VBUN en células HEP-2.

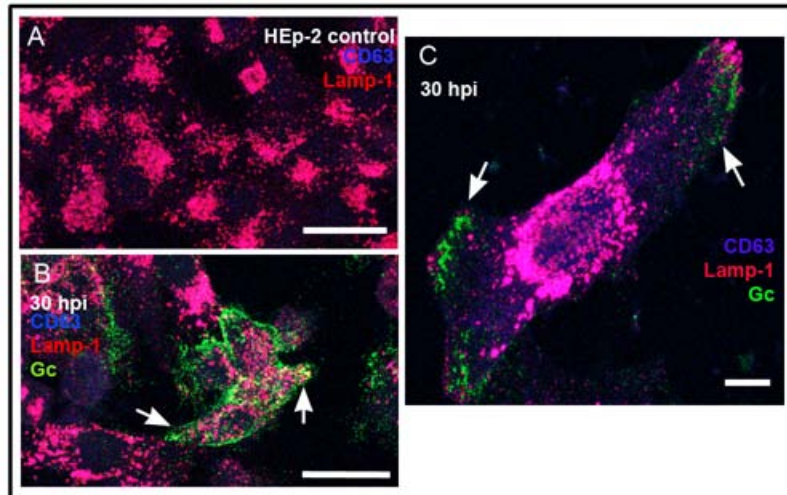


Figura R-49. Distribución de marcadores de lisosomas (Lamp-1 y CD63) y la glicoproteína Gc en células HEp-2 control e infectadas con el VBUN. CD63 (azul), Lamp-1 (rojo), Gc (verde). (A) Células HEp-2 control. (B) y (C) Células HEp-2 infectadas a 30 hpi. Las flechas blancas indican señal de Gc próxima a membrana plasmática. Las señales de Lamp-1 y CD63 se reclutan al interior celular. Barras en (A) y (B) 25 μ m y en (C) 10 μ m.

3.4. Detección de proteínas implicadas en adhesión celular en células HEp-2 por Western blot.

Se infectaron monocapas de células HEp-2 durante 30 horas y se detectaron las proteínas virales N y Gc por Western blot (Figura R-50-A). Se buscaron posibles cambios de expresión de proteínas relacionadas con la adhesividad celular: integrina α 5, integrina β 5, vimentina, N-WASP, cortactina, β -tubulina y vinculina. Los controles de carga fueron las proteínas actina y clatrina. Para la detección de las integrinas, los extractos celulares fueron recogidos en tampón de lisis RIPA. Para el resto de las proteínas estudiadas se utilizó el tampón Laemmli2. Se estudió la proteína LC3 de los autofagosomas; se observó que la isoforma citosólica de aproximadamente 17 kDa fue mayoritaria respecto a la isoforma que se encuentra en las membranas de los autofagosomas de 15 kDa, tanto en las muestras procedentes de células HEp-2 control, como de células HEp-2 infectadas (Figura R-50-B).

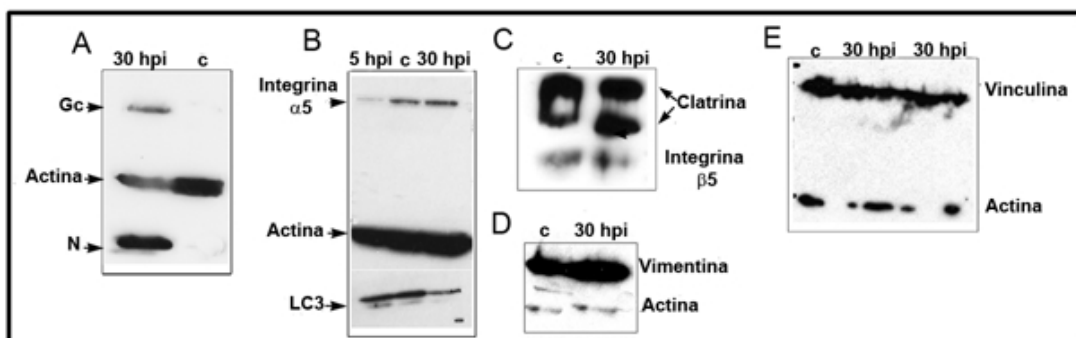


Figura R-50. Western blot de proteínas virales VBUN, de adhesión celular y filamentos intermedios. (A) Western blot con anticuerpos contra las proteínas virales, Gc y N, en muestras control e infectadas a 30 hpi. (B) Detección de integrina A5 y de LC3 en muestras control e infectadas a dos tiempos, 5 y 30 hpi. (C) Detección de integrina B5 usando como control de carga clatrina. (D) Detección de vimentina en muestras control e infectadas a 30 hpi. (E) Detección de vinculina en muestras control e infectadas a 30 hpi.

No se detectaron cambios significativos en las proteínas estudiadas de muestras de células HEp-2 infectadas, excepto un ligero aumento de vimentina a 30 hpi (Figura R-50-D). Tampoco se detectó un incremento en los niveles de LC3, a pesar de que se observó un posible aumento en el número de autofagosomas en células HEp-2 infectadas con el VBUN en los cortes de microscopía electrónica y los ensayos de fluorescencia. Esto puede deberse a que no todas las células HEp-2 están infectadas transcurridas 30 horas, tan sólo el 62,5% de las células.

4. Ensayo de adhesividad en células control e infectadas con VBUN.

El estudio de las estructuras membranosas multilamelares se completó con un ensayo funcional para estudiar si las estructuras tienen relación con la capacidad de adhesión de las células al sustrato. Se realizó un ensayo usando Tripsina-EDTA, que demostró una mayor resistencia al despegue en las células BHK-21 y MRC-5 infectadas con VBUN en comparación con las células no infectadas. Sin embargo, las células HEp-2, que no desarrollaron estructuras membranosas multilamelares, fueron más sensibles al tratamiento, desprendiéndose de la placa rápidamente con un comportamiento similar para las células control e infectadas.

El ensayo consistió en el recuento de células infectadas y control después de ser tratadas con una disolución de Tripsina-EDTA 0,1M (Tripsina al 0,25% y EDTA al 0,02% en PBSx1) a distintos tiempos de incubación a 37°C (1, 2 y 5 min). Primero, se hicieron recuentos de las células control e infectadas previamente a la adición de Tripsina-EDTA, siendo tomados estos valores como referencia del 100% de células adsorbidas (Figuras R-51-A1 hasta R-51-A3 y R-51-B1 hasta R-51-B3). Transcurridos los tiempos de incubación, se repitieron los recuentos celulares para comprobar el número de células adsorbidas a la placa tras el tratamiento con Tripsina-EDTA 0,1M. Las células BHK-21 control que quedaban se redondearon y perdieron la morfología de fibroblasto, desprendiéndose del sustrato rápidamente (Figuras R-51-A4 hasta R-51-A6). Las células BHK-21 infectadas y tratadas con Tripsina-EDTA, desarrollaron largas prolongaciones celulares similares a las visualizadas en los vídeos de célula viva e infectada (Figuras R-51-B4 hasta R-51-B6). Las células BHK-21 infectadas mostraron una mayor resistencia a tratamientos con Tripsina-EDTA frente a las células control y se desprendieron en menor número. Las estructuras membranosas por tanto porían aumentar la adhesividad celular de las células infectadas evitando la pérdida de contacto con la placa de cultivo.

Respecto a las células MRC-5, su respuesta fue similar a la de las células BHK-21. Las células MRC-5 control, fueron más sensibles a los tratamientos con Tripsina-EDTA que las células MRC-5 infectadas con VBUN (resultados no mostrados después del tratamiento con Tripsina-EDTA). El número de células MRC-5 infectadas y tratadas con Tripsina-EDTA durante 2 min y que se desprendieron de la placa de cultivo fueron muy escasas. También las células MRC-5 infectadas desarrollaron largas prolongaciones (Figura R-52-A3) como las células BHK-21. Por último, las células HEp-2 tanto control (resultados no mostrados después del tratamiento con Tripsina-EDTA) como infectadas, se desprendieron rápidamente de la placa de cultivo al ser tratadas con Tripsina-EDTA 0,1M (Figuras R-52-B1 hasta R-52-B3). Las células HEp-2, que no forman estructuras membranosas multilamelares en ningún caso, fueron más susceptibles a tratamientos contra la adhesión celular que las células BHK-21 y MRC-5.

La cuantificación de estos ensayos se resume en la Figura R-53. En células BHK-21 y MRC-5 infectadas con VBUN, el porcentaje de células adsorbidas después de los tratamientos con Tripsina-EDTA fue superior en las células no infectadas. El porcentaje de células BHK-21 y MRC-5 control no desprendidas tras el tratamiento, fue del 20% aproximadamente (1 y 2 min de tratamiento) mientras que toda la monocapa control se desprendió al ser incubada durante 5 min con Tripsina-EDTA (Figuras R-53-A y R-53-C). El 54,54% de las células BHK-21 infectadas, no se desprendieron después del tratamiento durante 5 min de Tripsina-EDTA (Figura R-53-B), mientras que en células MRC-5 infectadas este porcentaje se redujo a 16,25% (Figura R-53-D). Las diferencias encontradas entre células BHK-21 y MRC-5 infectadas pueden deberse al grado de citotoxicidad producido por la infección del VBUN, siendo mayor en células humanas. En el resto de los tiempos estudiados (1 y 2 min) tanto en células BHK-21 como MRC-5 infectadas, más del 50% de las células se mantuvieron sin desprenderse de la placa de cultivo. En el caso de las células HEp-2 control e infectadas, el 100% de la monocapa se desprendió rápidamente a los 5 min de tratamiento (Figuras R-53-E y R-53-F). El porcentaje de células HEp-2 control e infectadas adsorbidas en los tiempos restantes, 1 y 2 min, fue inferior al 10%.

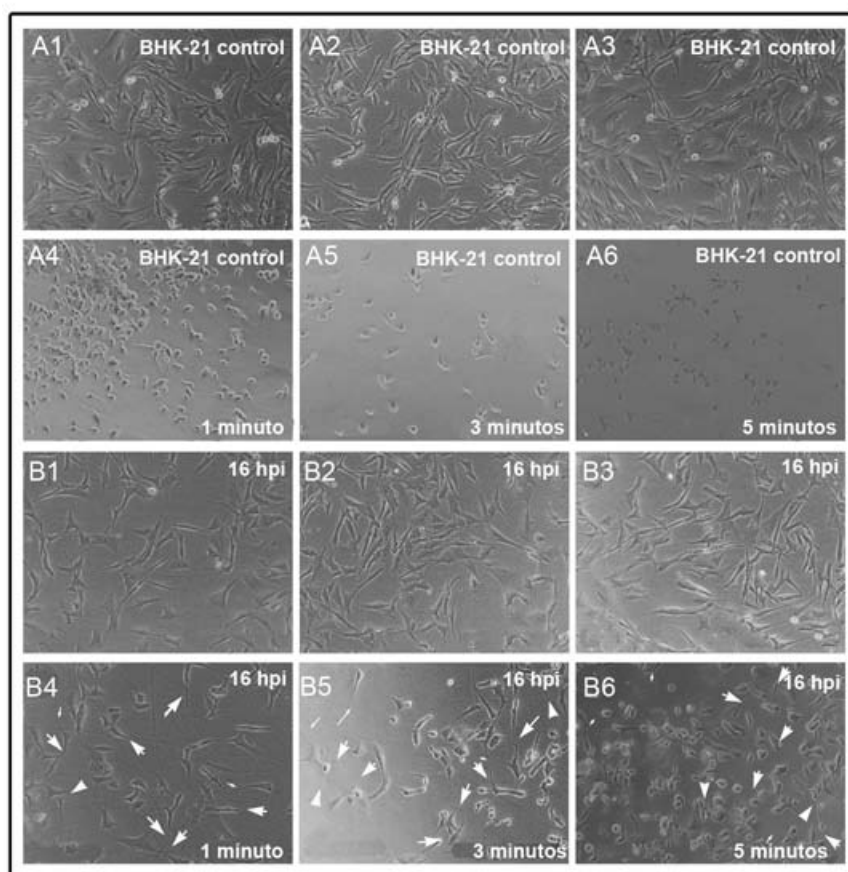


Figura R-51. Células BHK-21 control e infectadas con VBUN a 16 hpi (1 UFP/célula) antes y después del tratamiento con Tripsina-EDTA 0,1M. Desde (A1) hasta (A3) células BHK-21 control antes del tratamiento. Desde (A4) hasta (A6) células BHK-21 control después del tratamiento. La mayoría de las células se desprenden de la placa de cultivo. Desde (B1) hasta (B3) células BHK-21 infectadas a 16 hpi antes del tratamiento. Desde (B4) hasta (B6) células BHK-21 infectadas a 16 hpi después del tratamiento. Las flechas blancas indican largas prolongaciones celulares.

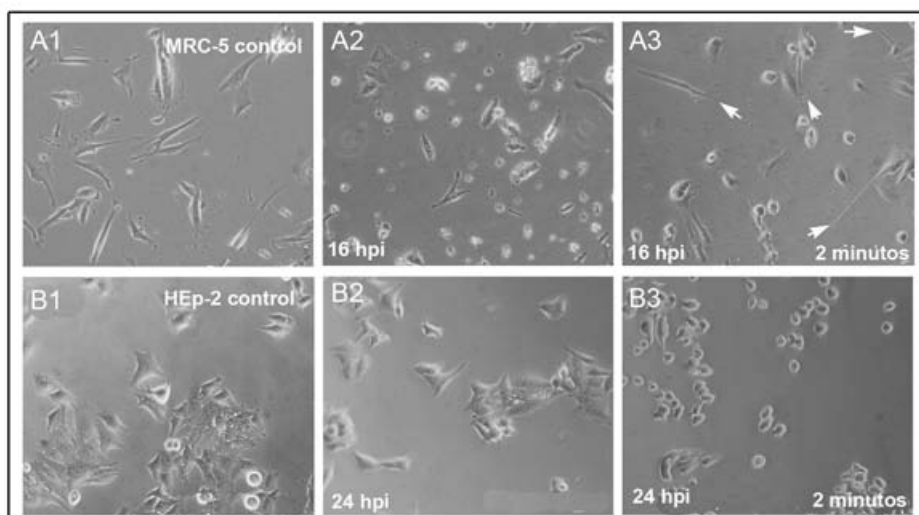


Figura R-52. Células MRC-5 y HEp-2 control e infectadas con VBUN antes y después del tratamiento con Tripsina-EDTA 0,140 M. Desde (A1) hasta (A3) células MRC-5. (A1) Células MRC-5 control. (A2) Células MRC-5 infectadas a 16 hpi antes del tratamiento con Tripsina-EDTA. (A3) Células MRC-5 infectadas a 16 hpi, después del tratamiento durante 2 min con Tripsina-EDTA. Desde (B1) hasta (B3) células HEp-2. (B1) Células HEp-2 control. (B2) Células HEp-2 infectadas a 24 hpi antes del tratamiento con Tripsina-EDTA. (B3) Células HEp-2 24 hpi después del tratamiento durante 2 min con Tripsina-EDTA.

En resumen, las células, BHK-21 y MRC-5, que desarrollan estructuras membranosas multilamelares en las regiones basales, fueron más resistentes a los tratamientos con Tripsina-EDTA. Las células BHK-21 y MRC-5 infectadas fueron más resistentes a estos tratamientos que las células BHK-21 y MRC-5 control. Este resultado podría ser explicado porque durante la infección del VBUN en estas células, se incrementa la complejidad y número de las estructuras multilamelares como respuesta ante la liberación constante de nuevas partículas virales en las regiones basales proceso que provoca el levantamiento de las células y una pérdida parcial de adhesión al sustrato. Sin embargo, las células HEp-2, que no desarrollan las estructuras multilamelares, ni en células control ni en células infectadas, rápidamente se desprendieron del sustrato al ser tratadas con Tripsina-EDTA. En las células HEp-2 infectadas, las nuevas partículas virales son liberadas por regiones medias-apicales, de forma que no serían necesarias las estructuras multilamelares ya que no existe una pérdida de adhesividad en regiones basales.

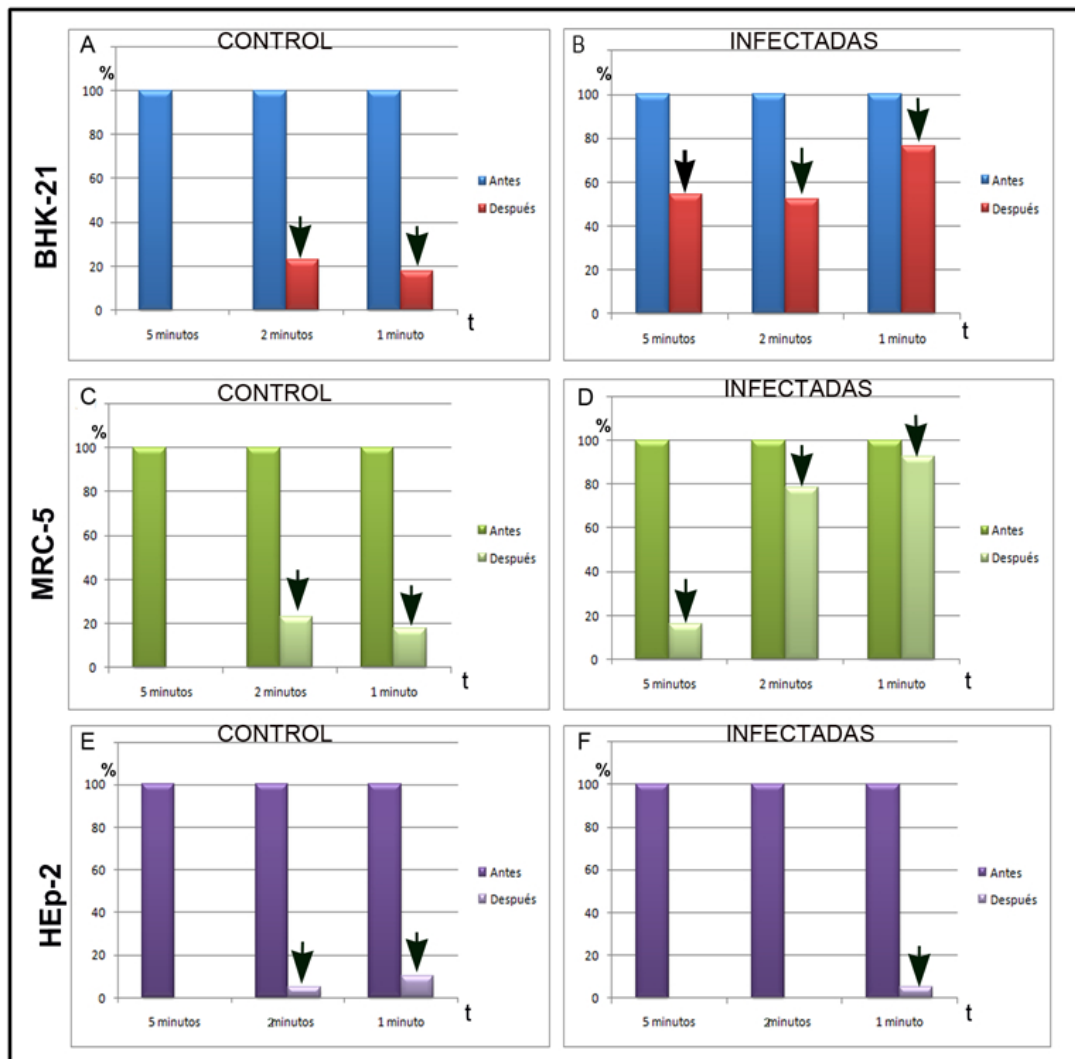


Figura R-53. Porcentaje de células adsorbidas BHK-21, MRC-5 y HEp-2 control e infectadas con VBUN antes y después del tratamiento con Tripsina-EDTA. (A) y (B) Células BHK-21. (C) y (D) Células MRC-5. (E) y (F) Células HEp-2. (A) Células BHK-21 control. (B) Células BHK-21 infectadas a 16 hpi (1 UPF/célula). (C) Células MRC-5 control. (D) Células MRC-5 infectadas a 16 hpi (1 UFF/célula). (E) Células HEp-2 control. (F) Células HEp-2 infectadas a 24hpi. Las flechas negras indican el porcentaje de células adsorbidas después del tratamiento con Tripsina-EDTA en células control e infectadas con VBUN.

5. Liberación del VBUN en células BHK-21 y MRC-5. Tratamiento con drogas de depolimerización de actina.

El estudio de las regiones basales de células BHK-21 y MRC-5 infectadas con el VBUN proporcionó información sobre nuevas estructuras celulares: estructuras membranosas relacionadas con la adhesividad celular y además filamentos extracelulares, a los que se adhieren los virus recién liberados.

El último bloque de resultados de esta tesis, recoge la caracterización estructural de los filamentos proteicos extracelulares asociados a las nuevas partículas virales VBUN en estas líneas celulares.

5.1. Liberación de nuevos virus en células BHK-21 y MRC-5.

Las nuevas partículas virales recién liberadas de las células infectadas aparecieron asociadas a filamentos extracelulares, resultado que se obtuvo tanto en cortes perpendiculares como en cortes paralelos a la base de células infectadas (Figura R-54). Dependiendo de la orientación de la sección, se observó que los filamentos provenían del interior de las células, pero sin conexión aparente con ningún orgánulo celular (Figuras R-54-A y R-54-B). Los filamentos aparecieron en regiones extracelulares y próximos a la membrana plasmática (Figura R-54-C). Las partículas virales asociadas a estos filamentos extracelulares la morfología característica de los viriones maduros. En monocapas de células BHK-21 infectadas en las que no se retiró el medio de cultivo durante la fijación, se observaron filamentos extracelulares de varias micras de longitud entre los que se detectaron partículas virales (Figura R-54-D). Los nuevos virus siempre aparecieron asociados a estos filamentos y los filamentos nunca aparecieron sin virus (Figura R-54-E y R-54-F). No se detectó conexión física entre los nuevos virus liberados y las estructuras membranosas multilamelares, ni tampoco entre los filamentos y las estructuras multilamelares.

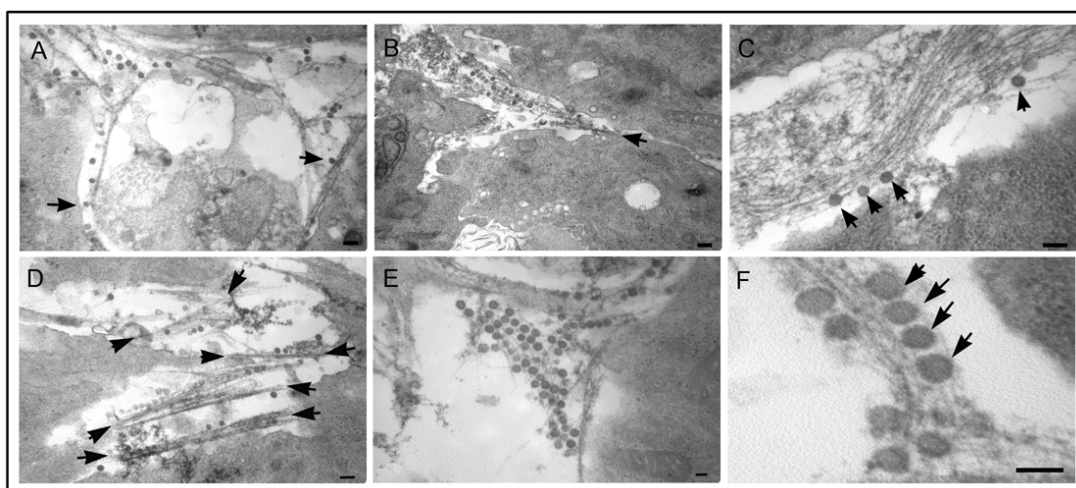


Figura R-54. Liberación del VBUN en regiones basales de células BHK-21 infectadas a 16 hpi (1 UFP/célula). Secciones de 75 nm de grosor. Desde (A) hasta (C), micrografías electrónicas de regiones basales en las que se detecta la liberación de VBUN de células BHK-21. Las flechas negras indican los virus y filamentos próximos a los virus. Desde (D) hasta (F), micrografías electrónicas de cortes procedentes de muestras sin eliminar el medio durante la fijación. Barras en (A), (B), (C), (D) y (E) 200 nm y en (F) 100 nm.

Los nuevos virus liberados de células MRC-5 también aparecieron asociados a filamentos extracelulares de varias micras de longitud. Los filamentos, similares a los visualizados en células BHK-21 infectadas, presentaron un alto contraste y se detectaron entre células MRC-5 infectadas (Figura R-55-A) próximos a la membrana plasmática de las regiones basales (Figura R-55-B). No se detectaron filamentos aislados sin virus. Dependiendo de la orientación del corte, los filamentos parecen proceder del interior de las células (Figura R-55-A).

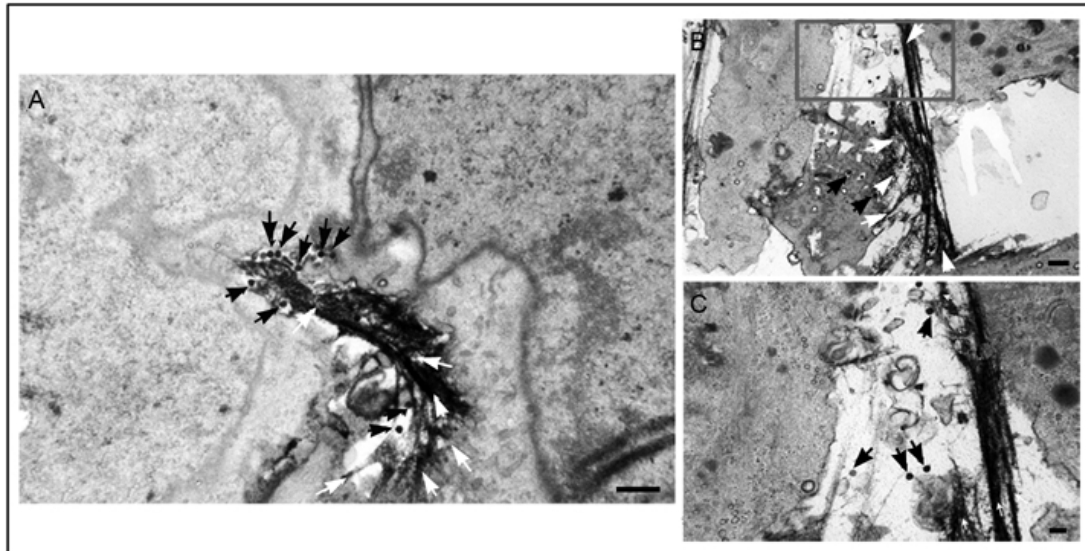


Figura R-55. Liberación del VBUN en regiones basales de células MRC-5 infectadas a 16 hpi (1 UFF/célula). Secciones de 75 nm de grosor. Las flechas negras apuntan a partículas del VBUN liberándose y las flechas blancas marcan los filamentos. (A) Micrografía electrónica de dos células MRC-5 infectadas situadas en región a 4-6 μm de altura desde la base celular. (B) Micrografía electrónica de la región basal de célula MRC-5 a 0,7 μm de altura desde la base celular. (C) Micrografía electrónica de la región ampliada procedente del cuadrado gris en (B). Barras 500 nm.

5.2. Inmunomarcajes en resina LR-WhiteTM.

Para estudiar la naturaleza de los filamentos extracelulares, se realizaron inmunomarcajes de monocapas de células BHK-21 infectadas a 16 hpi (1 UFP/célula) e incluidas en la resina LR-WhiteTM. En los cortes orientados, se detectaron con facilidad los filamentos asociados a la liberación de los nuevos virus en zonas basales (Figura R-56). Se realizaron los inmunomarcajes en células infectadas a 16 hpi para la detección de las siguientes proteínas: β -actina, vinculina, vimentina y cortactina.

Los inmunomarcajes de actina demostraron la presencia de esta proteína en los filamentos (Figura R-56-B). Se detectó señal de actina próxima a la envuelta viral de virus rodeados de este tipo de filamentos (Figura R-56-C). Respecto al resto de las proteínas estudiadas, vinculina, vimentina y cortactina, no se detectó señal en los filamentos extracelulares. Las señales de estas proteínas se detectaron en filamentos citoplasmáticos y próximos a la membrana plasmática (resultados no mostrados).

Los inmunomarcajes revelaron que los filamentos extracelulares relacionados con la liberación de nuevos virus en células BHK-21 infectadas, son filamentos de actina.

De forma similar se realizaron inmunomarcajes en células MRC-5 infectadas. Se estudiaron las mismas proteínas que en células BHK-21. En los filamentos extracelulares sólo se detectó señal de actina. En la Figura R-57, se recogen varias micrografías del inmunomarcaje con anti-actina en los filamentos extracelulares en células MRC-5 infectadas a 16 horas. Las señales de vimentina y β -tubulina se detectaron en filamentos intracelulares mientras que la señal de la vinculina y cortactina, en filamentos próximos a la membrana plasmática (resultados no mostrados).

Por tanto, en las células MRC-5 infectadas con VBUN, los filamentos extracelulares asociados a la liberación partículas virales son también filamentos de actina.

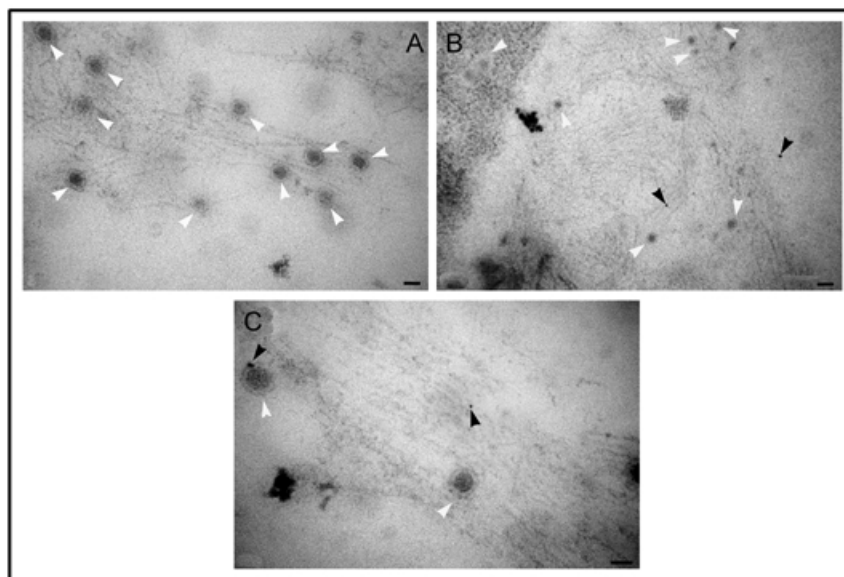


Figura R-56. Inmunomarcajes de los filamentos extracelulares de regiones basales de células BHK-21 infectadas a 16 hpi con VBUN (1 UFP/célula). (A) Micrografía electrónica de regiones basales de células BHK-21 en la que se observan virus VBUN (punta de flecha blanca) y filamentos extracelulares próximos. (B) y (C) Micrografías electrónicas donde se observan virus VBUN (punta de flecha blanca) y marca con anti-actina y un conjugado de oro coloidal de 10 nm (punta de flecha negra) en los filamentos extracelulares. Barras en (A) y (B) 100 nm y en (C) 50 nm.

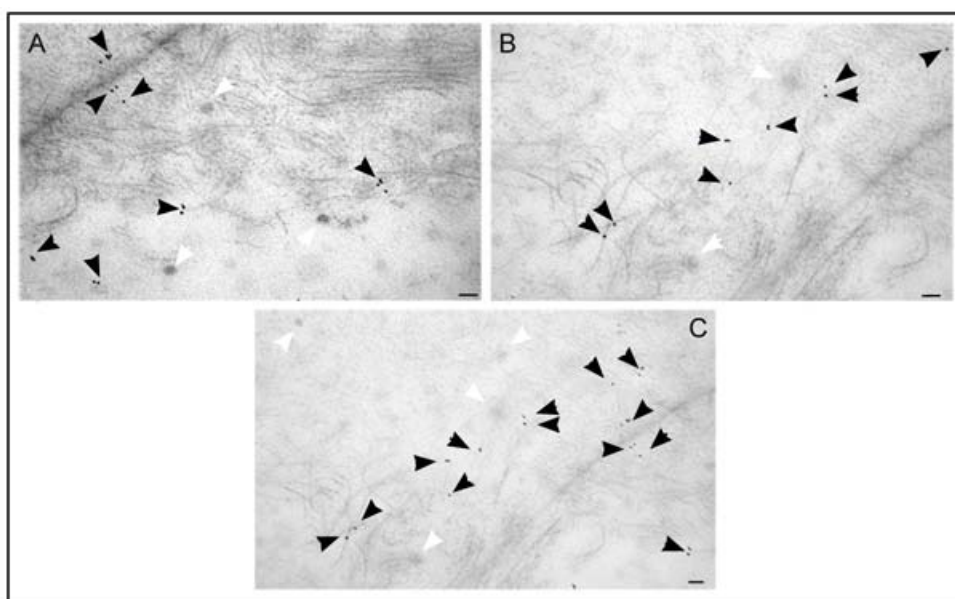


Figura R-57. Inmunomarcajes de los filamentos extracelulares de regiones basales de células MRC-5 infectadas a 16 hpi con VBUN (1 UFF/célula). (A), (B) y (C) Micrografías electrónicas de regiones basales de células MRC-5 infectadas en las que se detectó actina (15 nm, punta de flechas negras) en los filamentos extracelulares, entre los que se diferencian los virus VBUN liberados (punta de flechas blancas). Barras 100 nm.

5.3. Estudio de los filamentos de actina y de la liberación de nuevos virus por técnicas de inmunofluorescencia.

Se fijaron células BHK-21 control e infectadas a 16 hpi (1 UFP/célula) sin retirar el medio de cultivo, evitando agentes permeabilizantes y usando tampón de citoesqueleto para preservar los filamentos extracelulares de actina. Se utilizó el

anticuerpo anti-Gc como marcador de partículas virales extracelulares. Se observaron filamentos marcados con Faloidina (marcador de actina) (Figura R-58) próximos a la membrana plasmática de las células infectadas y conectando entre sí células. El patrón punteado de la señal anti-Gc apareció asociada a los filamentos de actina (Figuras R-57-B y R-57-C).

Estos resultados mostraron que los virus extracelulares se asocian masivamente a los filamentos de actina de la superficie de células BHK-21 infectadas con VBUN.

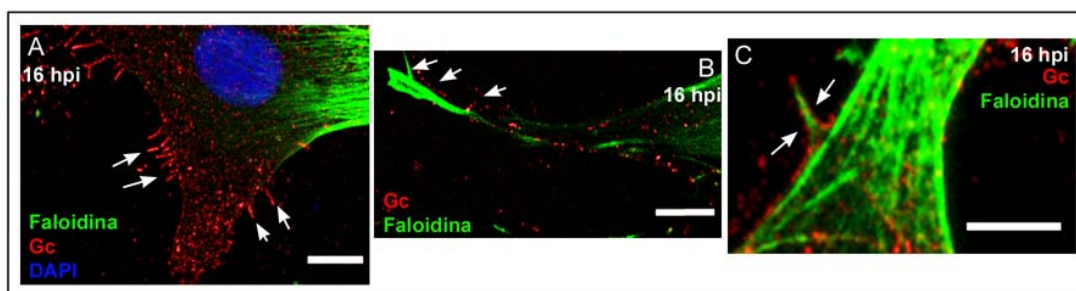


Figura R-58. Liberación de VBUN de células BHK-21 infectadas a 16 hpi (1 UFF/célula) sin permeabilizar en presencia del medio de cultivo. Faloidina 488 (verde), Gc (rojo) y DAPI (azul). (A) Célula BHK-21 infectada a 16 hpi, las flechas blancas indican señal de Gc. (B) Filamentos marcados con Faloidina y anti-Gc. (C) Extremo de una célula BHK-21 infectada, las flechas blancas apuntan a un filamento marcado con Faloidina y anti-Gc. Barras 10 μ m.

Se repitió el experimento en células MRC-5 infectadas con VBUN (Figura R-59). Durante la infección se observó el mismo tipo de señal del anticuerpo α -Gc, punteada sobre la superficie celular y asociada a filamentos con marca de Faloidina. Los filamentos aparecieron entre células, conectándolas. Los planos confocales confirmaron que la señal de anti-Gc apareció rodeada de la señal de Faloidina, recordando a las imágenes visualizadas en los cortes procedentes de MET.

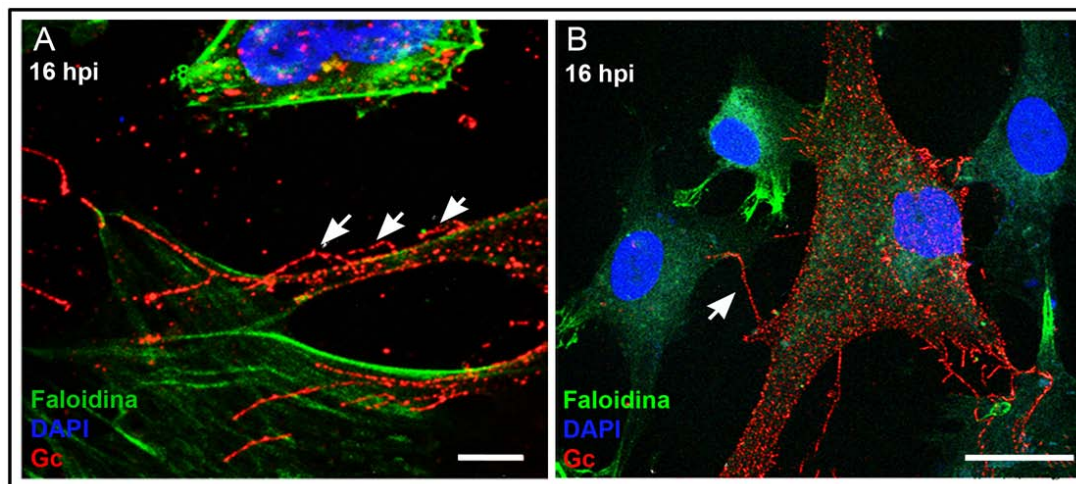


Figura R-59. Estudio del citoesqueleto de actina y la liberación de VBUN en células MRC-5 infectadas a 16 hpi (1 UFF/célula) con VBUN. Actina marcada con Faloidina 488 (verde), glicoproteína Gc (rojo), DAPI (azul). (A) y (B) Células MRC-5 infectadas. Las flechas blancas apuntan a la señal de la glicoproteína Gc asociada a filamentos marcados con Faloidina. Barra en (A) 5 μ m y en (B) 25 μ m.

Para estudiar si los filamentos extracelulares marcados con Faloidina estaban rodeados de membrana plasmática, se repitió la inmunofluorescencia usando la lectina WGA para marcar la membrana plasmática en ausencia de agentes

permeabilizantes (Figura R-60). En los filamentos marcados con Faloidina y anti-Gc no se detectó señal de la sonda WGA (Figuras R-60-B, R-60-C y R-60-D).

Por tanto, los filamentos de actina a los que se asocian los virus extracelulares no son prolongaciones celulares tipo filopodio; sino que se trata de haces de fibras de actina sin membrana plasmática, característica no descrita con anterioridad en la Bibliografía, por lo que se tratan de estructuras extracelulares.

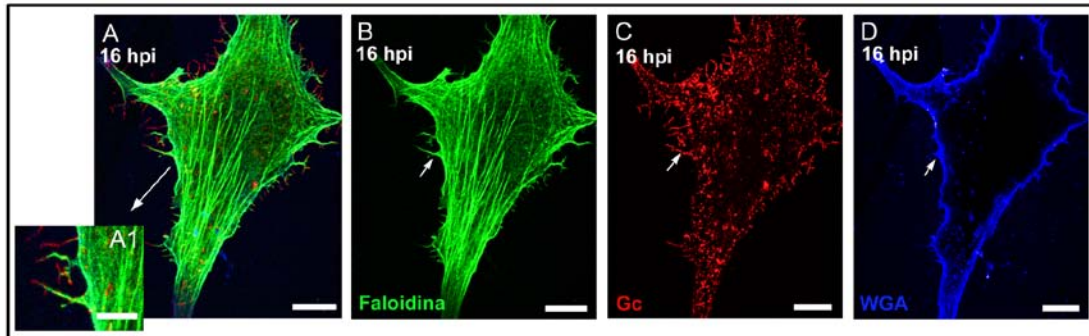


Figura R-60. Visualización de los filamentos de actina y de la membrana plasmática en células MRC-5 infectadas a 16 hpi (1 UFF/célula). Faloidina 488 (verde), Gc (rojo), WGA 647 (azul). (A) Células MRC-5 infectadas. (B) Proyección de la señal de Faloidina. (C) Proyección de la señal anti-Gc. (D) Proyección de la señal de la lectina WGA. (A1) Detalle de (A) Filamentos con señal de Faloidina y Gc, sin señal de WGA (comparar con la zona correspondiente en D, flechas blancas en B, C y D). Barras en (A), (B), (C), (D) 10 μ m y en (A1) 5 μ m.

Para estudiar la importancia de la actina en la liberación de nuevos virus, se utilizó la droga citocalasina-D. La citocalasina-D es un metabolito de origen fúngico que añadido a células vivas en cultivo se une a la actina e impide su polimerización y elongación. Por tanto, la citocalasina-D impide la polimerización de los filamentos de actina.

Se realizaron tres ensayos a distintas multiplicidades de infección en células BHK-21 y MRC-5, para comprobar el efecto de la droga en la propagación de los virus en el cultivo celular. Además, se recogieron los sobrenadantes de las muestras tratadas y sin tratar con citocalasina-D para ser titulados y comprobar si la presencia de la droga modificaba la cantidad de partículas virales producidas y liberadas al medio.

En el primer ensayo se crecieron células BHK-21 y MRC-5 control, infectadas e infectadas pero tratadas con citocalasina-D (2 μ M), siguiendo el protocolo de Fontana y cols., 2008. Las células BHK-21 y MRC-5 con y sin droga, se infectaron a 0,1 UFP/célula (Figura R-61). Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para detectar la localización de la glicoproteína Gc y del marcador de actina (Faloidina) utilizando tampón de citoesqueleto y en ausencia de agentes permeabilizantes. Transcurridas 16 hpi, el 20% de las células infectadas con VBUN y sin ser tratadas con la droga, estaban infectadas. En células infectadas pero tratadas con citocalasina-D, el porcentaje de células infectadas fue similar. Sin embargo, en estas células, desapareció la presencia de filamentos de actina extracelulares entre células. La señal de Gc se intensificó en la membrana plasmática, reduciéndose la señal característica de partículas extracelulares (Figura R-61).

Por tanto, la presencia de citocalasina-D añadida en los cultivos infectados con VBUN, no afectó a la replicación y morfogénesis viral, pero desaparecieron los filamentos extracelulares de actina y la señal de la glicoproteína Gc se concentró sobre la superficie celular.

Los resultados realizados a 1 UFP/célula fueron similares a los resultados usando 0,1 UFP/célula, con la única diferencia de que el porcentaje de células infectadas con y sin droga fue del 90% a las 8 hpi (resultados no mostrados).

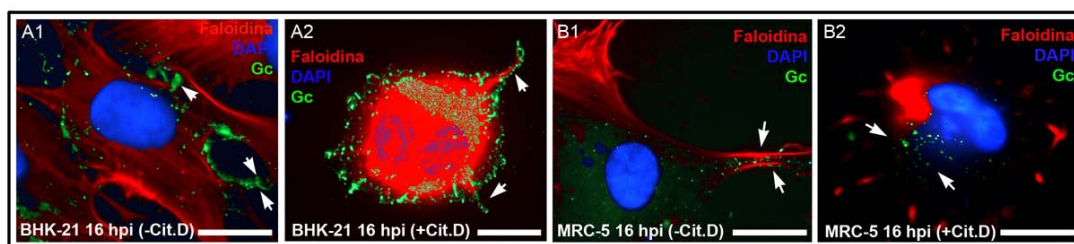


Figura R-61. Infección del virus VBUN en células BHK-21 y MRC-5 tratadas con citocalasina-D. Faloidina 594 (rojo), Gc (verde) y DAPI (azul). (A1) Célula BHK-21 infectadas a 16 hpi (0,1 UFP/célula), las flechas blancas indican la señal de Gc asociada a la señal de Faloidina. (A2) Célula BHK-21 infectada a las mismas horas post-infección que en (A1) y tratada con citocalasina-D; las flechas blancas indican señal de Gc retenida próxima a la membrana plasmática. (B1) Célula MRC-5 infectadas a 16 hpi (0,1 UFP/célula), las flechas blancas señalan filamentos de actina (Faloidina) con partículas virales (Gc). (B2) Célula MRC-5 infectada a las mismas horas post-infección y tratada con citocalasina-D. La señal de la glicoproteína Gc se concentró en la periferia de las células (flechas blancas) y desaparecieron los filamentos de actina extracelulares. Barras de 10 μ m.

El tercer ensayo se realizó a 0,5 UFP/célula a 10 y 14 hpi, también usando la lectina WGA para marcar el contorno celular. Transcurridas 10 hpi, el porcentaje de células infectadas con y sin citocalasina-D fue similar, aproximadamente el 95% de las células presentó señal anti-Gc. Después de 14 hpi, prácticamente el 100% de las células con y sin droga presentaron señal de Gc. La señal de Gc de las células tratadas con droga se intensificó en regiones de membrana y se redujo la señal extracelular. No se observaron filamentos marcados con Faloidina. Se estudiaron proyecciones ortogonales de las regiones basales (a una altura entre 1-1,5 μ m desde la base celular), coincidiendo con la máxima intensidad de fluorescencia del anticuerpo α -Gc. Los filamentos marcados con Faloidina y señal punteada de Gc, conectaron células infectadas a 14 hpi (Figura R-62-A). No se detectó señal de la lectina WGA rodeando los filamentos marcados con Faloidina (Figura R-62-B). De nuevo, al tratarse con citocalasina-D, la señal con anti-Gc quedó retenida en la membrana plasmática (Figuras R-62-C, R-62-D, R-62-G y R-62-H). La señal del anticuerpo α -Gc se asoció a estos filamentos de actina (Figura R-62-F) en ausencia de citocalasina-D.

Los resultados descritos demostraron que los filamentos marcados con Faloidina a los que se adhieren los virus extracelulares no son prolongaciones tipo filopodio ya que no se marcan con la sonda WGA, marcador de membrana plasmática en condiciones de no permeabilización. La presencia de citocalasina-D provocó la desaparición de los filamentos extracelulares de actina y la retención de la señal de los virus en membrana plasmática.

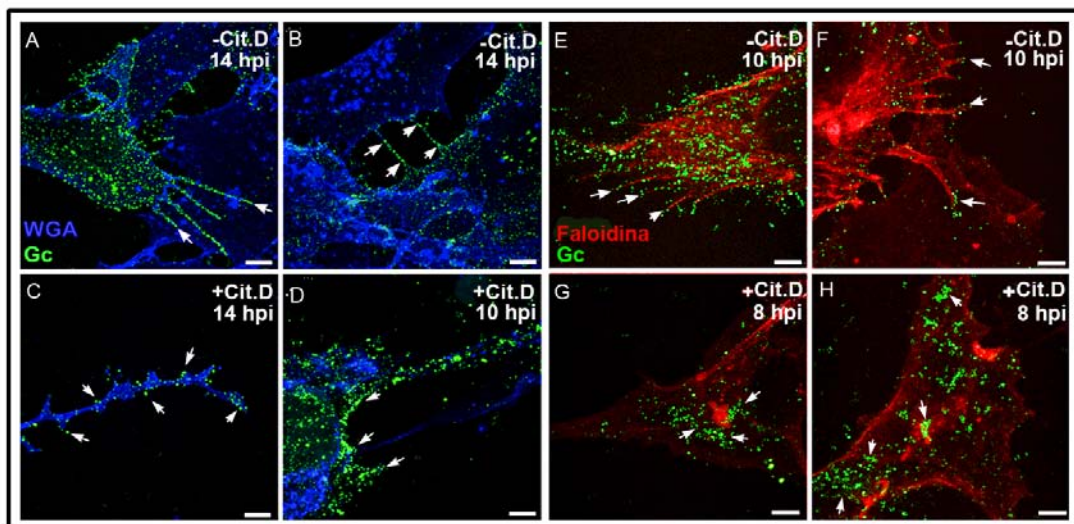


Figura R-62. Estudio de filamentos de células BHK-21 infectadas a 0,5 UFP/célula en regiones basales. (A) y (B) Células BHK-21 infectadas a 14 hpi. Las flechas blancas señalan filamentos marcados con Gc que interconectan células. (C) y (D) Células BHK-21 infectadas a 14 y 10 hpi respectivamente tratadas con citocalasina-D. Las flechas blancas señalan la señal de Gc, retenida en la membrana plasmática. (E) y (F) Células BHK-21 infectadas a 10 hpi. Las flechas blancas señalan filamentos de actina (Faloidina) con partículas virales (Gc). (G) y (H) Células BHK-21 infectadas a 8 hpi tratadas con citocalasina-D. Las flechas blancas marcan la señal de Gc. Barras de 5 μ m.

En la Tabla R-3 se muestran los resultados de las titulaciones de los sobrenadantes con y sin citocalasina-D. Los sobrenadantes procedentes de las células infectadas y tratadas con citocalasina-D alcanzaron un título viral de una unidad logarítmica menor en comparación con las muestras sin tratar con la droga.

En conclusión, la citocalasina-D podría alterar una de las vías utilizadas por el virus VBUN para la salida y propagación a células vecinas. Los filamentos extracelulares de actina pueden jugar un papel en la propagación del VBUN en las células en cultivo.

Tabla R-3. Titulaciones de sobrenadantes procedentes de células BHK-21 infectadas con y sin citocalasina-D.

Titulación	Sin citocalasina-D (UFP/célula)	Con citocalasina-D (UFP/célula)
8 hpi (MOI = 1)	10^5	3×10^3
10 hpi (MOI = 0.5)	$2,8 \times 10^4$	$6,5 \times 10^3$
16 hpi (MOI = 0.1)	$1,75 \times 10^4$	3×10^3

Discusión

El estudio de las regiones basales de células de mamífero infectadas con el VBUN ha permitido la caracterización de nuevas estructuras relacionadas con la adhesividad celular (estructuras membranosas) y la liberación de las nuevas partículas virales (filamentos de actina). En este trabajo se ha avanzado en la caracterización de la infección del VBUN profundizando en su última etapa, la liberación de nuevos virus. Además se ha estudiado, la infección del VBUN en dos líneas humanas diferentes: MRC-5 y HEP-2.

La membrana plasmática es un orgánulo altamente dinámico que protege a la célula de patógenos externos (Burckhardt y Grebe, 2009). Además de definir la extensión celular, mantiene en equilibrio los componentes intracelulares respecto al medio extracelular. Es una barrera pasiva y altamente selectiva para iones, nutrientes y productos residuales (Alberts y cols., 1986). Debido a los cambios drásticos en la morfología celular a menudo son necesarios importantes cambios en el área de la membrana plasmática. Las propiedades mecánicas de la membrana plasmática se combinan con cambios en la organización de los filamentos del citoesqueleto para que puedan darse modificaciones rápidas en la morfología de la célula (Liu y cols., 2008).

La habilidad de las células para resistir cambios rápidos en la tensión de la membrana plasmática, puede ser explicada por la existencia de reservorios de bicapa lipídica (Titushkin y Cho, 2006). Un reservorio membranoso puede tener implicaciones en mecanismos de electromovilidad de la célula (Morimoto y cols., 2002). Estos reservorios de membrana se han estudiado predominantemente en células fagocíticas y plaquetas. El exceso de membrana puede ser movilizada en macrófagos para reponer rápidamente la membrana plasmática que es endocitada durante la fagocitosis (Raucher y Sheetz, 1999). En las plaquetas, existen numerosas invaginaciones de la membrana plasmática que contienen la membrana necesaria para la extensión de largos filopodios. Estas extensiones de membrana, podrían rápidamente organizarse y empujar las células unas a otras cuando están en movimiento, participando en la señalización celular (Sowinski y cols., 2008). Existen evidencias experimentales de que los nanotúbulos membranosos pueden conectar varios tipos de células, incluyendo células nerviosas y células del sistema inmune (Rustom y cols., 2004; Davis, 2007). Resultados similares se han encontrado en otros tipos de células, sugiriendo que el acoplamiento eléctrico entre nanotúbulos sea una forma de comunicación altamente conservada entre las células (Wang y cols., 2010). También permitirían el intercambio de orgánulos y pequeñas moléculas. En linfocitos T en cultivo, se ha detectado un exceso significativo de membrana plasmática almacenado en forma de ondas de membrana o “ruffles” (como revelaron experimentos de ósmosis, Sowinski y cols., 2008). En los linfocitos T, los nanotúbulos membranosos presentaron una longitud media de $22 \pm 3 \mu\text{m}$, siendo entre 5 y 10 veces más largos que los puentes entre filopodios y pudiendo llegar a alcanzar en algunos casos las $100 \mu\text{m}$ de longitud (Sowinski y cols., 2008). Los nanotúbulos membranosos son estructuras que al conectar entre sí las linfocitos T, tienen una gran importancia en la propagación del VIH-1 (Sowinski y cols., 2008). En células de riñón de rata, los nanotúbulos ($10\text{-}70 \mu\text{m}$ de longitud) están constituidos por F-actina. La existencia de reservorios de membrana en fibroblastos ha sido demostrada con la presencia de finos tubos membranosos desarrollados desde la superficie de la célula (Raucher y Sheetz, 1999). Existe un reservorio de membrana en fibroblastos NIH-3T3 de ratón que sirve para amortiguar las posibles fluctuaciones en la tensión de la membrana plasmática (Raucher y Sheetz, 1999). En este sentido, el exceso de membrana plasmática no organizada en regiones basales de

las células BHK-21 y MRC-5 detectadas en este trabajo, proporcionaría los elementos de partida para la construcción de las estructuras multilamelares que conseguirían un incremento en la superficie de contacto con el sustrato favoreciendo la adhesividad de la célula durante la liberación de las nuevas partículas virales. Otro ejemplo de exceso de membrana plasmática se encuentra en las células externas capilares, OHC (del inglés Outer Hair Cell). En estas células, el reservorio de membrana podría estar formado por fragmentos de membrana curvados a escala nanométrica (Morimoto y cols., 2002).

Las estructuras membranosas visualizadas en cortes de microscopía electrónica de células BHK-21 y MRC-5 infectadas con el VBUN, son lamelas membranosas individuales, situadas en las regiones basales de las células y derivadas de la membrana plasmática. Los resultados de microscopía correlativa mostraron que las prolongaciones desarrolladas en las células BHK-21 infectadas, terminaban en estructuras membranosas multilamelares complejas (2-3 por célula) conectadas a la membrana plasmática. Las estructuras membranosas no son estructuras tipo podosoma, roseta, filopodio, desmosoma o hemidesmosoma; tampoco se tratan de uniones estrechas tipo “tight junction” o uniones comunicantes “gap junction”, sino estructuras nuevas y complejas inducidas por la infección del virus VBUN durante la fase de liberación de nuevos virus.

El mecanismo de formación de los reservorios membranosos aún no está bien caracterizado (Titushkin y Cho, 2006). La base anatómica para los reservorios podría originarse en ondulaciones de la membrana plasmática que se alisan cuando se produce un incremento de tensión (Titushkin y Cho, 2006). Está demostrado que, bajo una considerable tensión, el reservorio de membrana podría disminuir en tamaño pero cuando se recupera la tensión original, se podría recoger el exceso de membrana y recuperar el tamaño inicial (Raucher y Sheetz, 1999). Las estructuras membranosas y multilamelares estudiadas en esta tesis, podrían originarse en este tipo de reservorios de membrana plasmática. Por otro lado, se ha encontrado considerables diferencias respecto al reservorio de membranas en diferentes tipos de células (Titushkin y Cho, 2006); tampoco han sido encontradas estructuras membranosas complejas en nuestro estudio detallado de células epiteliales HEp-2. Si el reservorio de membrana está continuamente distribuido por la superficie de la célula (Evans y cols., 2003), diferencias en el tamaño celular podrían al menos parcialmente provocar también diferencias en el tamaño del reservorio de membrana (Titushkin y Cho, 2006). La falta de estructuras membranosas complejas en células HEp-2 podría estar relacionada con la región de liberación del VBUN en la célula. La liberación de las nuevas partículas virales en regiones medias-apicales de células HEp-2, no provocaría una pérdida significativa de la adhesividad celular en zonas basales. En nuestros estudios de células HEp-2 infectadas manteniendo el medio de cultivo durante la fijación, se detectaron restos de membranas próximas a la membrana plasmática pero sin organización compleja multilamelar. Este hecho indicaría que en células HEp-2 infectadas también existe un exceso de membrana, pero no se organiza en estructuras multilamelares complejas. El comportamiento de las células tiene importantes implicaciones para la reorganización de la membrana plasmática y el citoesqueleto celular (Raucher y Sheetz, 1999) de forma que, durante la infección de VBUN en células BHK-21 y MRC-5, la existencia de un exceso de membrana reorganizada en estructuras membranosas multilamelares en las regiones basales podría incrementar el área de contacto de la célula con la placa de cultivo. De esta forma, se compensaría la pérdida de adhesión producida por el levantamiento de

las células infectadas como consecuencia de la liberación constante de nuevos virus por estas regiones.

Las estructuras membranosas multilamelares han sido detectadas tanto en células BHK-21 y MRC-5 control como en células infectadas, pero durante la infección se incrementaron en número y en complejidad. La hipótesis de trabajo de las estructuras membranosas se basó en el diseño estructural y el modo de contacto con la superficie de la placa de cultivo, siendo similares a las de las terminaciones micro-nanométricas de los pies de los gecos. El espaciamiento entre las lamelas que forman parte de las estructuras membranosas fue semejante al encontrado entre las terminaciones finales de las espátulas de estos animales, aproximadamente 10 nm. También se encontró similitud entre la longitud de las estructuras membranosas (0,6-0,8 μm) y las terminaciones finales de los pies de los gecos (0,5 μm). Los gecos pueden escalar rápidamente superficies verticales e incluso invertidas, utilizando sus almohadillas adhesivas (Peattie y cols., 2007). La capacidad adhesiva es muy alta y no depende de sustancias químicas (Hansen y Autumn, 2005), pero sí del diseño y el modo de contacto con la superficie (Autumn y cols., 2000). La capacidad adhesiva de los pies de estos animales reside en el contacto directo de sus almohadillas con el sustrato a través de Fuerzas de Van der Waals (Autumn y cols., 2002).

La falta de información en la Bibliografía en cuanto a estas novedosas estructuras, podría relacionarse con el tipo de orientación en los cortes para su estudio en microscopía electrónica de transmisión. Tradicionalmente, el estudio de células infectadas para microscopía electrónica, se realiza usando pellets celulares en los que cada célula quedaba incluida en una orientación diferente. Los cortes orientados y seriados utilizados en estas tesis, han permitido acceder a la visualización de estructuras membranosas lábiles en las regiones basales de las células, favoreciendo una orientación adecuada para el estudio y análisis de células completas y el acceso a una región poco estudiada por microscopía electrónica.

El descubrimiento de las estructuras membranosas inducidas por la infección del VBUN en células BHK-21 condujo al estudio de la posible existencia de estas estructuras membranosas en otras líneas celulares de origen humano, MRC-5 y HEP-2, susceptibles al VBUN. En estas líneas celulares se pudieron utilizar anticuerpos que reconocieran proteínas relacionadas con el citoesqueleto y la adhesividad celular con mayor eficacia que en células BHK-21. En las células MRC-5, la infección del VBUN ocurre de forma similar a la estudiada en las células BHK-21. La factoría viral en células MRC-5 se desarrolló en regiones yuxtánucleares, con reclutamiento de mitocondrias, RER y aparato de Golgi. El VBUN en células MRC-5 madura en el aparato de Golgi. El estado de fragmentación de las endomembranas celulares durante la infección fue superior al observado en células BHK-21 infectadas. Como consecuencia de la elevada citotoxicidad del VBUN en las células MRC-5, el título viral fue inferior al alcanzado en células BHK-21. Está descrito en la Bibliografía, que en fibroblastos existe una fuerte asociación entre la membrana plasmática y el citoesqueleto celular (Raucher y cols., 2000b) y por esta razón, se quiso comprobar si las proteínas del citoesqueleto podrían estar relacionadas con las estructuras membranosas derivadas de la membrana plasmática. Aunque se hizo una detallada búsqueda de proteínas relacionadas con la adhesividad celular (integrina $\alpha 4$, integrina $\alpha 5$, integrina $\beta 5$) y citoesqueleto celular (Rho-A, vinculina, cortactina, vimentina, β -tubulina y actina) por técnicas de inmunofluorescencia y bioquímicas, no se observó ningún cambio significativo en los niveles de expresión ni en la organización de estas proteínas durante la infección. Sólo se observó la redistribución de los filamentos de actina hacia la periferia celular. Estos estudios no proporcionaron por tanto ningún

dato sobre la señalización implicada en la formación de las estructuras membranosas multilamelares en células infectadas.

La caracterización de las nuevas estructuras membranosas multilamelares se completó con un ensayo de su posible función utilizando agentes contra la adhesividad celular (Tripsina-EDTA). Dado que las células BHK-21 y MRC-5 infectadas con el VBUN desarrollaron complejas estructuras membranosas, si nuestra hipótesis es correcta, resistirían mejor los tratamientos contra la adhesividad celular. Efectivamente, las células BHK-21 y MRC-5 infectadas fueron más resistentes al tratamiento que las células no infectadas. Las células HEp-2 que no desarrollaron en ningún caso estructuras membranosas fueron muy sensibles a estos tratamientos, tanto las células control como las infectadas.

En resumen, son varios los datos que apoyaron nuestra hipótesis de que las estructuras membranosas son una respuesta celular para incrementar la adhesión celular como consecuencia de la liberación de las nuevas partículas virales en regiones basales: el diseño estructural altamente organizado en numerosas multilamelas recordó al diseño estructural de los pies de los gecos, compartiendo también las dimensiones a nivel micro-nanométrico; los resultados de vídeo-microscopía revelaron la formación de largas prolongaciones de la membrana plasmática durante la infección; los datos aportados por microscopía correlativa demostraron que el extremo de estas prolongaciones celulares terminaban en complejas estructuras membranosas; las células BHK-21 y MRC-5 infectadas que desarrollan estructuras membranosas en las regiones basales fueron menos susceptibles a los tratamientos contra la adhesividad celular que las células control.

El segundo tipo de estructuras nuevas detectadas en esta tesis fueron los filamentos extracelulares de actina, relacionados con la liberación del VBUN en células BHK-21 y MRC-5, detectados también en las regiones basales de las células. Los estudios de inmunofluorescencia y microscopía electrónica demostraron la ausencia de membrana plasmática rodeando a estos filamentos, por lo que no son colas de actina, filopodio, invadopodia, ni microvilli. Tampoco contactan con las estructuras membranosas multilamelares. Muchos virus han desarrollado la capacidad de alterar el citoesqueleto de actina en su propio beneficio; algunos ejemplos son el virus vaccinia, (Ploubidou y cols., 2000), el virus de la Fiebre Porcina Africana (Alonso y cols., 2001), el citomegalovirus (Fish y cols., 1996) y del virus herpes simplex (Avitabile y cols., 1995). Una vez completado su ensamblaje, el virus vaccinia alcanza la membrana plasmática induciendo la polimerización de actina y ensamblando una “cometa” de actina que lo transporta a la célula vecina (Rietdorf y cols., 2001; Ward y Moss, 2001). La formación de colas o cometas de actina por parte del virus vaccinia ocurre justo debajo de la membrana plasmática (Rietdorf y cols., 2001) y depende de la familia de quinasas-Scr y de la fosforilación de la proteína integral de membrana A36R (Frischknecht y cols., 1999). El movimiento de los virus dependientes de F-actina sobre la superficie celular se observó primero en el Retrovirus VLM y después en el virus que provoca la leucemia aviar, que se desplaza sobre microvilli y filopodio ricos en actina. Además en filopodios, el flujo direccional de F-actina es particularmente importante para la transmisión de virus entre células polarizadas del aparato respiratorio o del intestino y de las células inmunes (Sherer y Mothes, 2008). Datos recientes indican que el flujo direccional de F-actina es una importante puerta de entrada a las células no infectadas para una gran variedad de virus (Lehman y cols., 2009). Los filamentos extracelulares de actina asociados a la liberación del VBUN, no están rodeados de membrana plasmática y por tanto, no son filopodios, ni cometas de actina. La

propagación del virus VIH-1 entre células del sistema inmune se incrementa por adhesiones célula a célula, denominadas sinapsis virales (Hübner y cols., 2009). Estos contactos de transmisión de la infección viral están regulados por la adhesión celular a través de integrinas y moléculas intracelulares de adhesión (Jolly y cols., 2007a), actina y tubulina (Jolly y cols., 2007b), moléculas de señalización celular (Sol-Foulon y cols., 2007) y reclutamiento de la membrana plasmática (Jolly y cols., 2005). Los filamentos extracelulares de actina visualizados en las regiones basales en células BHK-21 y MRC-5 infectadas con VBUN, tampoco presentan las características estructurales de las sinapsis virales.

La presencia de drogas depolimerizantes de actina en el cultivo de células BHK-21 y MRC-5 infectadas, no bloqueó la replicación ni el ensamblaje del VBUN como ya se sabía por estudios anteriores (Fontana y cols., 2008). Sin embargo, sí provocó un descenso en el número de virus VBUN liberados al medio bloqueando también la formación de filamentos extracelulares de actina con virus asociados. Estos resultados indican que los filamentos extracelulares de actina participan en la propagación de nuevos virus. Es evidente que el proceso de polimerización de estos filamentos debe ocurrir en el interior celular. En algunas secciones se observaron haces de filamentos saliendo del interior de las células. En este sentido, en células MRC-5 infectadas la señal de cortactina detectada por inmunofluorescencia se intensificó en la periferia de la célula y en prolongaciones filamentosas que conectan células entre sí. La cortactina es una proteína citosólica monomérica que puede ser activada por diversos estímulos externos, promoviendo la polimerización y reorganización del citoesqueleto de actina, especialmente la actina cortical próxima a la periferia celular (Ammer y Weed, 2008). La cortactina, asistida por el complejo proteico Arp2/3, nuclea las ramificaciones de actina sobre todo en regiones apicales y periféricas de la célula (Weaver y cols., 2001). La forma inactiva de la cortactina se sitúa de forma difusa en el citoplasma, pero cuando se fosforila, la proteína comienza a retenerse en ciertas áreas corticales de la célula, coincidiendo con el marcaje de cortactina observado durante la infección con VBUN en células MRC-5. El intenso marcaje del contorno celular de células MRC-5 infectadas, podría relacionarse con los filamentos extracelulares proteicos de actina asociados a la liberación de las partículas virales. Por otro lado, estudios no publicados de nuestro laboratorio señalan que en las regiones basales de células BHK-21 control e infectadas existe una importante cantidad de restos de la matriz extracelular. Diversos estudios han demostrado que el VBUN libera sus nuevas partículas en vesículas de secreción y de forma secundaria por lisis celular (Schmaljohn y Hooper, 2001). Componentes de la matriz extracelular podrían, junto con la actina, formar parte de estos filamentos extracelulares asociados con las nuevas partículas virales en lo que sería una forma alternativa de dispersión y propagación viral en cultivo. La polimerización de estos filamentos de actina extracelulares podría favorecer a la propagación de las nuevas partículas virales en los cultivos celulares.

En la Figura D-1 se muestra un resumen de los datos obtenidos en los estudios de las regiones basales de las células BHK-21 y MRC-5 infectadas con VBUN y la caracterización de las estructuras membranosas y filamentos con las nuevas partículas virales.

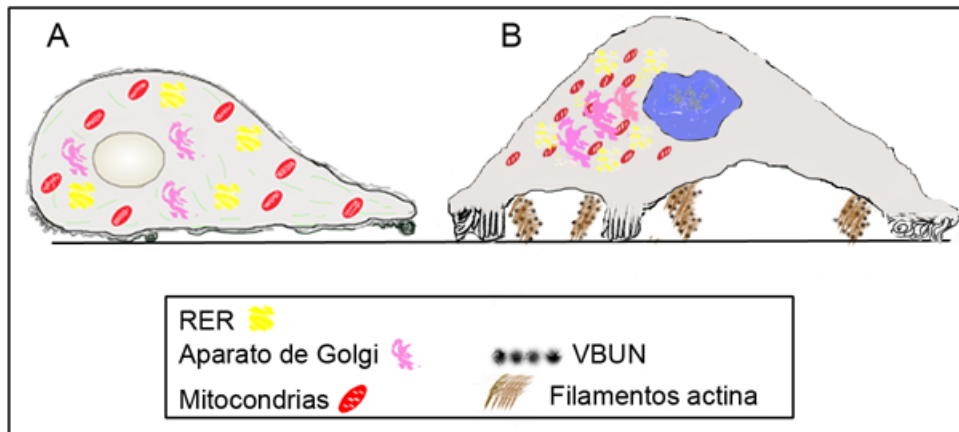


Figura D-1. Estructuras membranosas y filamentos asociados a la liberación del VBUN en células BHK-21 y MRC-5. (A) Representación de una célula control cortada perpendicularmente a la base celular estudiada por MET. Las estructuras membranosas de células control se sitúan en regiones basales pero son escasas y poco complejas. (B) Representación de una célula infectada cortada perpendicularmente a la base celular estudiada por MET. Las estructuras membranosas multilamelares complejas se forman en las regiones basales en contacto con el sustrato. La liberación de las numerosas partículas virales se produce en asociación a filamentos extracelulares de actina. En las regiones próximas al núcleo celular se representa la factoría viral formada por el reclutamiento de mitocondrias, aparato de Golgi y RER.

La infección del virus VBUN en células HEp-2, provocó una fragmentación espectacular de las endomembranas, muy superior a la observada en células BHK-21 y MRC-5 infectadas. Probablemente, la falta de colocación entre marcadores de las regiones del *cis-media* Golgi y las proteínas virales esté relacionada con el propio estado de las membranas del aparato de Golgi. La vacuolización e incremento del número de autofagosomas junto a la pérdida de señal de los marcadores en células HEp-2 infectadas, fueron ejemplos del daño celular provocado por el VBUN. La formación de los autofagosomas se induce en respuesta a determinadas señales, como puede ser la falta de nutrientes en el medio o la infección viral (Wileman, 2006). Probablemente, la citotoxicidad del VBUN en células HEp-2 provocó dificultades en la propagación viral en la monocapa: las células HEp-2 infectadas mueren rápidamente, produciendo bajos títulos virales. Estudios realizados por Southam y cols., 1963, demostraron daño celular similar en células HEp-2 infectadas por el virus Guarao, VGRO. La infección fue difusa por todo el cultivo celular y se detectaron procesos de “bubbling” coincidiendo con la infección del VBUN en estas mismas células. Virus similares al VBUN, como el virus de La Crosse o el virus de la Fiebre del Valle del Rift, llegan al sistema nervioso central a través del torrente sanguíneo. Las células epiteliales son la primera barrera física de protección frente agentes externos. La naturaleza epitelial de las células HEp-2 podría estar relacionada con la manera en que se liberan los nuevos virus. Las células epiteliales están divididas en dos dominios, el dominio apical y el basolateral, los cuales están constituidos de distinta manera (Ikonen, 1989). El dominio apical y el basolateral se diferencian no sólo en la composición proteica sino en la lipídica (Simons y Meer, 1988). El dominio apical es el que está en contacto con el lumen de los órganos y el basolateral con la membrana basal. El *Hantavirus* “Black Creek”, es liberado de una forma polarizada por el dominio apical (Ravkov y cols., 1997) igual que el VBUN en células HEp-2. La liberación de los virus por una zona u otra de la membrana plasmática puede influir en la patogenicidad (Boulton y cols., 1978). Por ejemplo, la mayoría de los virus que afectan al tracto respiratorio (como virus influenza,

parainfluenza y el virus respiratorio sincitial) son liberados preferentemente por regiones apicales de las células epiteliales, de forma que se favorece las infecciones locales del tracto respiratorio. Virus que son liberados por regiones basolaterales, tienen acceso directo a tejidos y a la sangre, facilitando el desarrollo de una infección sistémica (Kolesnikova y cols., 2007).

La liberación del VBUN en células HEp-2 ocurre bien por muerte y lisis celular o aparentemente en vesículas hasta la membrana plasmática en regiones medias-apicales, en ausencia de filamentos extracelulares de actina. Este hecho coincide con la ausencia de estructuras complejas membranosas en las regiones basales de las células HEp-2 infectadas y con el hecho de que la liberación de las nuevas partículas virales en células HEp-2 no provoca una pérdida de adhesividad en las regiones basales.

En la Figura D-2 se representan un resumen de la infección del VBUN en células HEp-2.

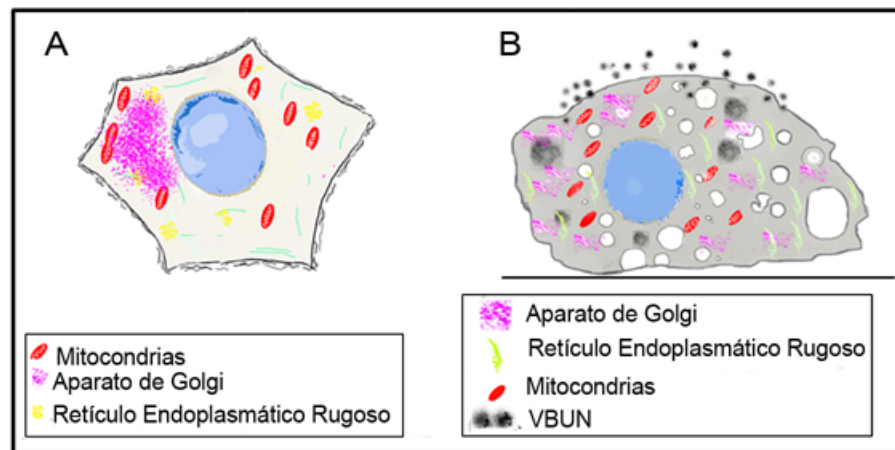


Figura D-2. Resumen de la infección del virus VBUN en células epiteliales humanas HEp-2. (A) Representación de una célula HEp-2 control cortada paralelamente a la base celular. (B) Representación de una célula HEp-2 infectada con VBUN cortada perpendicularmente a la base celular. Los estudios de inmunofluorescencia y de MET revelaron que la liberación viral ocurre en regiones medias-apicales de las células, sin asociación a filamentos extracelulares de actina. No se detectaron estructuras membranosas multilamelares complejas en regiones basales de estas células.

Los datos presentados en esta tesis han demostrado la existencia de estructuras relacionadas con la adhesividad celular y la liberación de nuevas partículas virales en regiones basales de células infectadas con VBUN. En el futuro, sería interesante abordar el estudio de la biogénesis de las estructuras membranosas, así como la búsqueda de otros virus de liberación basal, para saber si la presencia de las estructuras membranosas multilamelares son una respuesta general asociada a la liberación de los virus por regiones basales. Por otro lado, la identificación de las rutas de señalización implicadas nos permitiría entender cómo se desarrolla esta respuesta en las células infectadas. Finalmente, en relación a los filamentos de actina asociados a la liberación de nuevos virus, los mecanismos que los generan y la posible participación de componentes de la matriz extracelular, están por definir.

Conclusiones

Realizada la caracterización estructural de las regiones basales de células de BHK-21, MRC-5 y HEp-2 infectadas con el VBUN, podemos concluir:

1. Durante la infección con el VBUN, las células BHK-21 y MRC-5 desarrollaron estructuras multilamelares complejas en las regiones basales, coincidiendo con la zona de liberación de nuevos virus.
2. Las estructuras membranosas derivaron de la membrana plasmática y no conectaron con ningún orgánulo celular, por lo que probablemente se forman a partir de los reservorios de membrana de la superficie celular.
3. Las células BHK-21 y MRC-5 infectadas con VBUN fueron más resistentes a tratamientos contra la adhesividad celular que las células no infectadas, por lo que las estructuras membranosas parecen ser una respuesta celular para evitar la pérdida de adhesión durante la liberación de virus en regiones basales.
4. La liberación de los nuevos VBUN en células HEp-2 ocurre en regiones medias-apicales y estas células no desarrollan estructuras membranosas, siendo más sensibles a los tratamientos contra la adhesividad celular que células BHK-21 y MRC-5.
5. En células BHK-21 y MRC-5, las nuevas partículas virales aparecen asociadas a filamentos extracelulares de actina. La inhibición de su formación con citocalasina-D provocó un descenso en el número de virus infectivos liberados al medio por lo que los haces de filamentos de actina extracelulares podrían participar en la liberación y la propagación de nuevas partículas virales.

Bibliografía

1. **Abercrombie M., Heaysman J.E.M., Pegrum S.M.** (1971). The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Expl Cell Res.* **67**, 359-367.
2. **Ahola T., Kujala P., Tuittila M., Blom T., Laakkonen P., Hinkkanen A., Auvinen P.** (2010). Effects of palmitoylation of replicase protein nsP1 on alphavirus infection. *J Virol.* **74** (15), 6725-33.
3. **Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Robberts K., Walter O.** (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Fourth Edition. Garland Science, Taylor & Francis Group. New York, 908, 931
4. **Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Robberts K., Watson D.J.** (1986). *Biología Molecular de la célula*. Ed Omega Barcelona. **6**, 269.
5. **Alonso C., Miskin J., Hernaez B., Fernandez-Zapatero P., Soto L Canto C., Rodriguez-Crespo I., Dixon L., Escribano J.M.** (2001). African Swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein. *J Virol.* **75**, 9819-9827.
6. **Altenburg B.C., Graham D.Y., Este M.K.** (1980). Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells. *J Gen Virol.* **46**, 75-85.
7. **Ammer A.G., Weed S.A.** (2008). Cortactin branches out: roles in regulating protrusive actin dynamics. *Cell Motil Cytoskeleton.* **65** (9), 687-707.
8. **Anderson J.M.** (2001). Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci.* **16**, 126-130.
9. **Anderson C.R., Spence L., Downs W.G., Aitken T.H.** (1961). Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. *Am J Trop Med Hyg.* **10**, 574-8.
10. **Andersson A.M., Pettersson R.F.** (1998). Targeting of a short peptide derived from the cytoplasmic tail of the G1 membrane glycoprotein of Uukuniemi virus (Bunyaviridae) to the Golgi complex. *J Virol.* **72** (12), 9585-9696.
11. **Arzt E., Gorb S., Spolenak R.** (2003). From micro to nano contacts in biological attachment devices. *Proc Natl Acad Sci.* **100**, 10603-10606.
12. **Autumn K., Sitti M., Liang Y.A., Peattie A.M., Hansen W.R., Sponberg S., Kenny T.W., Fearing R., Israelachvili J.N., Full R.J.** (2002). Evidence for van der Waals adhesion in gecko setae. *Proc Natl Acad Sci.* **99** (19), 12252-6.
13. **Autumn K., Liang Y.A., Hsieh S.T., Zesch W., Chan W.P., Kenny W.T., Fearing R., Full R. J.** (2000). Adhesive force of a single gecko foot-hair. *Nature.* **405**, 681-685.
14. **Avitabile E., Di Gaeta S., Torrisi M.R., Ward P.L., Roizman B., Campadelli-Fiume G.** (1995). Redistribution of microtubules and Golgi apparatus in herpes simplex virus-infected cells and their role in viral exocytosis. *J Virol.* **69**, 7472-7482.
15. **Baltimore D.** (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev.* **35** (3), 235-41.
16. **Barreiro O., Sánchez-Madrid F.** (2009). Bases moleculares de las interacciones leucocito-endotelio durante la respuesta inflamatoria. *Rev Esp Cardiol.* **62**, 552-562.
17. **Benenson A.S.** (1990). *Control of Communicable Diseases in Man*. American Public Health Association. 15th edition. pg 44-46.
18. **Bennett R.S., Cress C.M., Ward J.M., Firestone C.Y., Murphy B.R., Whitehead S.S.** (2008). La Crosse virus infectivity, pathogenesis, and immunogenicity in mice and monkeys. *J Virol.* **5**, 25.
19. **Biederbick A., Kern H.F., Elsasser H.P.** (1995). Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol.* **66**, 3-14.
20. **Bishop D. H., Gay M.E., Matsuoko Y.** (1983). Nonviral heterogeneous sequences are present at the 5' ends of one species of snowshoe hare Bunyavirus S complementary RNA. *Nucleic Acids Res.* **11**, 6409-6418.
21. **Bhattacharya B, Roy P.** (2008). Bluetongue Virus Outer Capsid Protein VP5 Interacts with Membrane Lipid Rafts via a SNARE Domain. *J Virol.* **82** (21), 10600-10612.
22. **Blau D.M, Compans R.W.** (1995). Entry and release of measles virus are polarized in epithelial cells. *Virology.* **210** (1), 91-99.
23. **Blair C.D., Adelman Z.N., Olson K.E.** (2000). Molecular Strategies for Interrupting Arthropod-Borne Virus Transmission by Mosquitoes *Clin Microbiol Rev.* **13** (4), 651-661.
24. **Borucki M.K., Chandler L.J., Parker B.M., Blair C.D. Beaty B.J.** (1999). Bunyavirus superinfection and segment reassortment in transovarially infected mosquitoes. *J Gen Virol.* **80**, 3173-3179.
25. **Borrmann C.M., Mertens C., Schmidt A., Langbein L., Kuhn C., Franke W.W.** (2000). Molecular diversity diversity of plaques of epithelial adhering junctions. *Ann NY Acad Sci.* **915**, 144-150.
26. **Boulan E.R., Sabatini D.D.** (1978). Asymmetric budding of viruses in epithelialmonolayers: a model system for study of epithelial polarity. *Proc Natl Acad Sci.* **75**, 5071-5075.
27. **Bouloy P.M.** (2009). Rift Valley Fever virus: a review of recent data. *Bull Acad Vét.* **145**, (4).
28. **Bridgen A., Friedemann W., Fazakerley J.K, Elliot R.M.** (2001). Bunyamwera Bunyavirus non-structural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci.* **98**, 664-669.
29. **Briese, T., Bird B., Kapoor V., Nichol S.T., Lipkin W.I.** (2006). Batai and Ngari viruses: M segment reassortment and association with severe febrile disease outbreaks in East Africa. *J Virol.* **80**, 5627-5630.
30. **Buccione R., Orth J.D., McNiven, M.A.** (2004). Foot and mouth: podosomes, invadopodia and circular dorsal ruffles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **5** (8), 647-657.

31. **Burckhardt C.J., Greber U.F.** (2009). Virus movements on the plasma membrane support infection and transmission between cells. *PLoS Pathog.* **5** (11).
32. **Burridge K., Fath K., Kelly T., Nuckolls G., Turner C.** (1988). Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton *Annu Rev Cell Biol.* **4**, 487-525.
33. **Burridge K., Connel L.** (1983). Talin: a Cytoskeletal component concentrated in adhesion plaques and other sites of actin-membrane interaction. *Cell Motil.* **3**, 405-417.
34. **Calisher C.H.** (1988). Evolutionary significance of the taxonomic data regarding Bunyaviruses of the family Bunyaviridae. *Intervirology.* **29**, 268-276.
35. **Ceccaldi P.E., Valtorta F., Braud S., Hellio R., Tsiang H.** (1997). Alteration of the actin-based cytoskeleton by rabies virus. *J Gen Virol.* **78**, 2831-2835.
36. **Chen Y., Zhou Y., Lin X., Wong H.C., Xu Q., Jiang J., Wang S., Lurtz M.M., Louis C.F., Veenstra R.D., Yang J.J.** (2011). Molecular interaction and functional regulation of connexin50 gap junctions by calmodulin. *Biochem J.* PMID: 21320072.
37. **Chen P., Hubner W., Spinell M.A., Chen B.J.** (2007). Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses. *J Virol.* **81**, 12582-12595.
38. **Chen C.S., Alonso J.L., Ostuni E., Whitesides G.M., Ingber D.E.** (2003). Cell shape provides global control of focal adhesion assembly. *Biochem Biophys Res Commun.* **307** (2), 355-61.
39. **Chen M., Goorha R., Murti K.G.** (1986). Interaction of frog virus 3 with the cytomatrix. IV. Phosphorylation of vimentin precedes the reorganization of intermediate filaments around the virus assembly sites. *J Gen Virol.* **67**, 915-922.
40. **Choi K.S., Aizaki H., Lai M.M.** (2005). Murine coronavirus requires lipid rafts for virus entry and cell-cell fusion but not for virus release. *J Virol.* **79** (15), 9862-71.
41. **Clark, E.S., A.S. Whigham, W.G. Yarbrough, and A.M. Weaver.** (2007). Cortactin is an essential regulator of matrix metalloproteinase secretion and extra-cellular matrix degradation in invadopodia. *Cancer Res.* **67**, 4227–4235. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-392.
42. **Compans R. W., Herrler G.** (1998). Virus infection of epithelial cells, pg. 671–683. En P. L. Ogra, J. Mestecky, M. E. Lamm and W. Strober (ed.), *Mucosal immunology*. Academic Press, New York, N.Y.
43. **Connolly-Andersen A., Magnusson K.E., Mirazimi A.** (2007). Basolateral Entry and Release of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Polarized MDCK-1 Cells. *J Virol.* **81** (5), 2158-2164.
44. **Corde S.M., Candurra N.A.** (2003). Intermediate filament integrity is required for Junin virus replication. *Virus Res.* **97**, 47-55.
45. **Cyrklaff M., Risco C., Fernandez J.J., Jimenez M.J., Esteban M., Baumeister W., Carrascosa J.L.** (2005). Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci.* **102**, 2772-2777.
46. **Darcy K.J., Staras K., Collinson L.M., Goda Y.** (2006). An ultrastructural readout of fluorescent recovery after photobleaching using correlative light and electron microscopy. *Nat. Protoc.* **1**, 988-994.
47. **David-Pfeuty T., Singer S.J.** (1980). Altered distributions of cytoskeletal proteins vinculin and α -actinin in cultured fibroblasts transformed by Rous Sarcoma virus. *Proc Nat Acad Sci.* **77**, 6687-6691.
48. **Davis, D.M.** (2007). Intercellular transfer of cell-surface proteins is common and can affect many stages of an immune response. *Nature Rev Immunol.* **7**, 238-243.
49. **de Boer S.M., Kortekaas J., Antonis A.F., Kant J., van Oploo J.L., Rottier P.J., Moormann R.J., Bosch B.J.** (2010). Rift Valley fever virus subunit vaccines confer complete protection against a lethal virus challenge. *Vaccine.* **28** (11), 2330-2339.
50. **del Campo A, Arzt E.** (2007). Design parameters and current fabrication approaches for developing bioinspired dry adhesives. *Macromol Biosci.* **7** (2), 118-127.
51. **Domingo E., Holland J.J.** (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol.* **51**, 151-178.
52. **Dunn E.F., Pritlove D.C., Jin H, Elliott R.M.** (1995). Transcription of a recombinant Bunyavirus RNA template by transiently expressed Bunyavirus proteins. *Virology.* **211**, 133-43.
53. **Dunn E.F., Pritlove D.C., Elliott R.M.** (1994). The S RNA genome segments of Batai, Cache Valley, Guarao, Kairi, Lumbo, Main Drain and Northway Bunyaviruses: sequence determination and analysis. *J Gen Virol.* **75**, 597-608.
54. **Eichwald C., Rodriguez J. F., Burrone O.R.** (2004). Characterization of rotavirus NSP2/NSP5 interactions and the dynamics of viroplasm formation. *J Gen Virol.* **85**, 625–634.
55. **Eifan S.A., Elliott R.M.** (2009). Mutational Analysis of the Bunyamwera Orthobunyavirus Nucleocapsid protein gene. *J Virol.* **83**, (21) 11307-11317.
56. **Elliott R.M.** (2009). Bunyavirus and the climate change. *Clin Microbiol Infect.* **15**(6), 510-517.
57. **Elliott R.M.** (1997). Emerging viruses. The Bunyaviridae. *Mol Med.* **3**, 572-577.
58. **Elliott R.M., Schmaljohn C.S., Collet M.S.** (1991). Bunyaviridae genome structure and gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol.* **169**, 91-141.
59. **Elliott R.M.** (1990). Molecular biology of the Bunyaviridae. *J Gen Virol.* **71**, 501-522.
60. **Evans E., Heinrich V., Ludwig F., Rawicz W.** (2003). Dynamic tension spectroscopy and strength of biomembranes. *Biophys J.* **85**, 2342-2350.
61. **Fazakerley J.K., Ross A.M.** (1989). Computer analysis suggests a role for signal sequences in processing polypeptides of enveloped RNA viruses and as a mechanism of viral fusion. *Virus Genes.* **2**, 223-239.

62. **Fiala J.C.** (2005). Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. *J Microsc.* **218**, 52-61.
63. **Fish K.N., Britt W., Nelson J.A.** (1996). A novel mechanism for persistence of human cytomegalovirus in macrophages. *J Virol.* **70**, 1855-1862.
64. **Fisher J.L., Levitan I., Margulies S.S.** (2004). Plasma membrane surface increases with tonic stretch of alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **2**, 200-208.
65. **Flint S.J., Enquist L.W., Krug R.M., Racaniello V.R., Skalka A.M.** (2005). Ed. Asm Press, Washington DC Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control. **5** pg 163, **8** pg 237, **9** pg 287.
66. **Fontana J., Fernández J.J., Tzeng W.P., López-Iglesias C., Frey T.K., Risco C.** (2010). Three-dimensional structure of Rubella virus factory. *Virology.* **405**, 579-591.
67. **Fontana J., López-Montero N., Elliott R.M., Fernandez J.J., Risco C.** (2008). The unique architecture of Bunyamwera virus factories around de Golgi Complex. *Cell Microbiol.* **10**, 2012-2028.
68. **Fontana J., Lopez-Montero N., Risco C.** (2007). Structural analysis of viral factories: from conventional microscopy to electron tomography. *Acta Microscopica.* **16**, 42-51.
69. **Freed E.O.** (2004a). HIV-1 and the host cell: an intimate association. *Trends. Microbiol.* **12**, 170-177.
70. **Freed E.O.** (2004b). Mechanisms of enveloped virus release. *Virus Res.* **106** (2), 85-96.
71. **Frischnecht F., Moreau V., Röttger S., Gonflon S., Reckmann I., Superti-Furga G., Way M.** (1999). Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signaling. *Nature.* **401**, 926-929.
72. **Frolova E.I., Gorchakov R., Pereboeva L., Atasheva S., Frolov I.** (2010). Functional Sindbis virus replicative complexes are formed at the plasma membrane. *J Virol.* **84** (22), 11679-95.
73. **Frugulhetti J.C.P., Rebello A.** (1989). Na⁺ and K⁺ concentration and regulation of protein synthesis in L-A9 and *Aedes albopictus* cells infected with Marituba virus (Bunyaviridae). *J Gen Virol.* **70**, 3493-3499.
74. **Fuller S., von Bonsdorff C.H., Simons K.** (1984). Vesicular stomatitis virus infects and matures only through the basolateral surface of the epithelial cell line, MDCK. *Cell.* **38**, 65-77.
75. **Garrod D.R.** (1993). Desmosomes and hemidesmosomes. *Curr Opin Cell Biol.* **5**, 30-40.
76. **Gavrilovskaya I.N., Brown E.J., Ginsberg M.H., Mackow E.R.** (1999). Cellular entry of Hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. *J Virol.* **5**, 3951-9.
77. **Geiger B., Bershadsky A.** (2002). Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell.* **110** (2), 139-42.
78. **Gerrard S.R., Rollin P.E., Nichol S.T.** (2002). Bidirectional Infection and Release of Rift Valley Fever Virus in Polarized Epithelial Cells. *Virology.* **301**, 226-235.
79. **Gimona M., Buccione R., Courtneidge S., Linder S.** (2008). Assembly and biological roles of podosomes and invadopodia. *Curr Opin Cell Biol.* **20** (2), 235-241.
80. **Gonzalez-Scarano F., Nathanson N.** (1996). Bunyaviridae. En BN Fields, DM Knipe (eds), Fields Virology, Raven Press, New York, pg. 1473-1504.
81. **Gonzalez-Scarano F., Janssen R.S., Najjar J.A., Pobjecky N., Nathanson N.** (1985). An avirulent G1 glycoprotein variant of La Crosse Bunyavirus with defective fusion function. *J Virol.* **54**, 757-763.
82. **Gubler D.J.** (2002). The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res.* **33**, 330-342.
83. **Gumbiner B.M.** (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell.* **84**, 345-357.
84. **Hacker J.K., Hardy J.L.** (1997). Adsorptive endocytosis of California encephalitis virus into mosquito and mammalian cells: a role for G1. *Virology.* **235**, 40-47.
85. **Hall A.** (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* **279**, 509-514.
86. **Haller O., Staeheli P., Kochs G.** (2007). Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *J Biochi.* **89**, 812-818.
87. **Hanein D, Matsudaira P., DeRosier D.J.** (1997). Evidence for a conformational change in actin induced by fimbrin (N375) binding. *J Cell Biol.* **139** (2), 387-96.
88. **Hansen W.R., Autumn K.** (2005). Evidence for self-cleaning in gecko setae. *Proc Natl Acad Sci.* **102**, 385-389.
89. **Harrison S.C.** (2008). Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol.* **15**, 690-698.
90. **Harrison S.C.** (2005). Mechanism of membrane fusion by viral envelope proteins, advances in virus research. In *Virus Structure and Assembly (Advances in Virus Research vol. 64)*, pp. 231-261. Edited by P. Roy. San Diego, CA: Elsevier Academic Press.
91. **Heath C.M, Windsor M., Wileman T.** (2001). Membrane association facilitates the correct processing of pp220 during production of the major matrix proteins of African swine fever virus. *J Cell Biol.* **153**, 449.
92. **Helenius, A., Aebi M.** (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science.* **291**, 2364-2369.
93. **Heymann J.B., Belnap D.M.** (2007). Bsoft: image processing and molecular modeling for electron microscopy. *J Struct Biol.* **157**, 3-18.
94. **Hinson E.R., Shone S.M., Zink M.C., Glass G.E., Klein S.L.** (2004). Wounding: the primary mode of Seoul virus transmission among male Norway rats. *Am J Trop Med Hyg.* **70**, 310-317.

95. Hochmuth R.M., Raucher D., Ting-Beall H.P., Sheetz M.P. (1999). Membrane-Cytoskeleton adhesion and detachment from cells with "excess" area. *Proceedings of the First Joint BMES/EMBS Conference*. **1**, 47.
96. Hollinshead M., Vanderplasschen A., Smith G.L., Vaux D.J. (2001). Vaccinia Virus Intracellular Mature Virions Contain only One Lipid Membrane. *J Virol*. **73** (2), 1503-1517.
97. Hopkinson S.B., Jones J.C.R. (2000). The N terminus of the transmembrane protein BP180 interacts with the N-terminal domain of BP230, thereby mediating keratin cytoskeleton anchorage to the cell surface at the site of the hemidesmosome. *Mol Biol Cell*. **11**, 277-286.
98. Hübner W., McNerney G.P., Chen P., Dale B.M., Gordon R.E., Chuang F.Y., Li X.D., Asmuth D.M., Huser T., Chen B.K. (2009). Quantitative 3D video microscopy of HIV transfer across T cell virological synapses. *Science*. **323** (5922), 1743-1747.
99. Huiskonen J.T., Overby A.K., Weber F., Grumewald. K. (2009). Electron cryo-microscopy and single-particle averaging of Rift Valley fever virus: evidence for GN_GC glycoproteins heterodimers. *J Virol*. **83** (8), 3762-3769.
100. Hynes R.O. (1992). Integrins: Versatility, modulation and signalling in cell adhesion. *Cell*. **69**, 11-25.
101. Ikonen E., Simons K. (1998). Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to the plasma membrane in polarized cells. *Semin. Cell Dev Biol*. **9**, 503-509.
102. Irschick D.J., Austin C.C., Petren K., Fisher R., Losos J.B., Ellers O. (1996). A comparative analysis of clinging ability among pad-bearing lizards. *Biol J Linnean Soc*. **59**, 21.
103. Jackson W.T., Giddings T.H. Jr., Taylor M.P., Mulinyawe S., Rabinovitch M., Kopito R.R., Kirkegaard K. (2005). Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol*. **3**, 156.
104. Jackson A.C., Ye H., Ridaaura-Sanz C., Lopez-Corella E. (2001). Quantitative study of the infection in brain neurons in human rabies. *J Med Virol*. **65** (3), 614-8.
105. Jin M., Park J., Lee S., Park B., Shin J., Song K.J., Ahn T.I., Hwang S.Y Ahn B.Y., Ahn K. (2002). Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Virology*. **294**, 60-69.
106. Jin H., Elliott R.M. (1993). Characterization of Bunyamwera virus S RNA that is transcribed and replicated by the L protein expressed from recombinant vaccinia virus. *J Gen Virol*. **67**, 1396-1404.
107. Jin H., Elliott R.M. (1992). Mutagenesis of the L protein encoded by Bunyamwera virus and production of monospecific antibodies. *J Gen Virol*. **73** (9), 2235-44.
108. Jolly C., Mitar I., Sattentau Q. (2007a). Adhesion Molecule Interactions Facilitate Human Immunodeficiency Virus Type 1-Induced Virological Synapse Formation between T Cells. *J Virol*. **81**, 13916.
109. Jolly C., Mitar I., Sattentau Q. (2007b). Requirement for an Intact T-Cell Actin and Tubulin Cytoskeleton for Efficient Assembly and Spread of Human Immunodeficiency Virus Type. *J Virol*. **81**, 5547.
110. Jolly C., Sattentau Q. (2005). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Virological Synapse Formation in T Cells Requires Lipid Raft Integrity. *J Virol*. **79**, 12088.
111. Jonsson C.B., Schmaljohn C.S. (2001). Replication of Hantaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. **256**, 15-32.
112. Kang J.I., Park S.H., Lee P.W., Ahn B.Y. (1999). Apoptosis is induced by Hantaviruses in cultured cells. *Virology*. **264**, 99-105.
113. Kanlaya R., Pattanakitsakul S.N., Sinchaikul S, Chen S.T., Thongboonkerd V. (2010). Vimentin interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and dengue nonstructural protein 1 and is important for viral replication and release. *Mol Biosyst*. **6** (5), 795-806.
114. Kanlaya R., Pattanakitsakul S., Sinchaikul S., Chen S.T., Thongboonkerd V. (2009). Alterations in Actin Cytoskeletal Assembly and Junctional Protein Complexes in Human Endothelial Cells Induced by Dengue Virus Infection and Mimicry of Leukocyte Transendothelial Migration. *J Proteome Res*. **8** (5), 2551-2562.
115. Kim T.W., Bhushan B. (2007). Effect of stiffness of multi-level hierarchical attachment system on adhesion enhancement. *Ultramicroscopy*. **107**, 902-912.
116. Koberna K., Staněk D., Malínský J., Ctrnáctá V., Cermanová S., Novotná J., Kopský V., Raska I. (2000). In situ fluorescence visualization of bromouridine incorporated into newly transcribed nucleolar RNA. *Acta Histochem*. **102** (1), 15-20.
117. Kochs G., Janzen C., Hohenberg H., Haller O. (2002). Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes. *Proc Natl Acad Sci*. **99**, 3153-3158.
118. Kohl A., Lowen A.C., Leonard V.H.J., Elliott R.M. (2006). Genetic elements regulating packaging of the Bunyamwera orthobunyavirus genome. *J Gen Virol*. **87**, 177-187.
119. Kohl A., Clayton R.F., Weber F., Bridgen A., Randall R.E., Elliott R.M. (2003). Bunyamwera virus nonstructural protein NSs counteracts interferon regulatory factor 3-mediated induction of early cell death. *J Virol*. **77**, 7999-8008.
120. Kolesnikova L., Ryabchikova E., Shestopalov A., Becker S. (2007). Basolateral Budding of Marburg Virus: VP40 Retargets Viral Glycoprotein GP to the Basolateral Surface. *JID*. **197**, (2).
121. Koster A.J., Klumperman J. (2003). Electron microscopy in cell biology integrating structure and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* (Supple S6), 10.

122. Kowalczyk A.P., Bornslaeger E.A., Norvell S.M., Palka H.L., Green K.J. (1999). Desmosomes: intercellular adhesive junctions specialized for attachment of intermediate filaments. *Int Rev Cytol.* **185**, 237-302.
123. Kumar N.M., Gilula, N.B. (1986). Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein. *J Cell Biol.* **103** (3), 767.
124. La Scola B., Desnue C., Pagnier I., Robert C., Barrassi L., Fournous G., Merchat M., Suzan-Monti M., Forterre P., Koonin E., Raoult D. (2008). The virophage, a unique parasite of the giant Mimivirus. *Nature.* **455**, 100-104.
125. La Scola B., Audic S., Robert C., Jungang L., de Lamballerie X., Drancourt M., Birtles R., Claverie J.M., Raoult D. (2003). A giant virus in amoebae. *Science.* **299**, 2033.
126. LaBeaud A.D., Muchiri E.M., Ndzovo M., Mwanje M. T., Muiruri S., Peters C. J., King C.H. (2008). Inter-epidemic Rift Valley fever virus seropositivity, northeastern Kenya. *Emerg Infect Dis.* **14** (8), 1240-1246.
127. Lake J.A., Carr J., Feng F., Mundy L., Burrell C., Li P. (2003). The role of Vif during HIV-1 infection: interaction with novel host cellular factors. *J Clin Virol.* **26**, 143-152.
128. Lampe, P.D., Lau, A.F. (2004). The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol.* **36** (7), 1171-86.
129. Lappin D.F., Nakitare W.G., Palfreyman J.W., Elliot R.M. (1994). Localization of Bunyamwera Bunyavirus G1 glycoprotein to the Golgi requires association with G2 but not with Nsm. *J Gen Virol.* **75** (12), 3441-3451.
130. Lednicky J.A. (2003). Hantavirus: a short review. *Arch Pathol Lab Med.* **127**, 30-35.
131. Lee H., Lee P.B., Messersmith P.B. (2007). A reversible wet/dry adhesive inspired by mussels and geckos. *Nature.* **19**, 448.
132. Le May N., Mansuroglu Z., Leger P., Josse T., Blot G., Billecocq A., Flick R., Jacob, Y., Bonnefoy E., Bouloy M. (2008). A SAP30 complex inhibits IFN-beta expression in Rift Valley fever virus infected cells. *PLoS Pathog.* **4** (1), e13.
133. Lescar J., Canard B. (2009). RNA-dependent RNA polymerases from flaviviruses and Picornaviridae. *Curr Opin Struct Biol.* **19** (6), 759-67.
134. Leonard V.H., Kohl A., Osborne J.C., McLees A., Elliott R.M. (2005). Homotypic interaction of Bunyamwera virus nucleocapsid protein. *J Virol.* **79**, 13166-13172.
135. Linder S. (2007). The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends Cell Biol.* **17** (3), 107-117.
136. Linder S., Aepfelbacher M. (2003). Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol.* **13** (7), 376-385.
137. Liu Y., Belkina N.V., Shaw S. (2009). HIV Infection of T Cells: Actin-in and Actin-out. *Sci Signal.* **2** (66), 23.
138. Liu A.P., Richmond D.L., Maibaum L., Pronk S., Geissler P.L., Fletcher D.A. (2008). Membrane-induced bundling of actin filaments. *Nat Phys.* **4**, 789-793.
139. López-Montero N., Risco C. (2011). Self-protection and survival of arbovirus-infected mosquito cells. *Cellular Microbiol.* **13** (2), 300-315.
140. Lowen A.C., Elliott R.M. (2005). Mutational Analyses of the Nonconserved Sequences in the Bunyamwera Orthobunyavirus S Segment Untranslated Regions. *J Virol.* **79**, 12861-12870.
141. Lozach P.Y., Mancini R., Bitto D., Meier R., Oestereich L., Overby A.K., Pettersson R.F., Helenius A. (2010). Entry of Bunyaviruses into mammalian cells. *Cell Host Microbe.* **7** (6), 488-99.
142. Ludwig G.V., Christensen B.M., Yuill T.M., Schultz K.T. (1989). Enzyme processing of La Crosse virus glycoprotein G1: a Bunyavirus-vector infection model. *Virology.* **171**, 108-113.
143. Luftig R.B., Lupo L.D. (1994). Viral interactions with the host-cell cytoskeleton: the role of retroviral proteases. *Trends in Microbiol.* **2**, 178-182.
144. Luo C., Wang K., Liu de Q., Li Y., Zhao Q.S. (2008). The functional roles of lipid rafts in T cell activation, immune diseases and HIV infection and prevention. *Cell Mol Immunol.* **5** (1), 1-7.
145. Maddon P.J., Dalgleish A-G., McDougal J.S., Clapham P.R., Weiss R.A., Axel R. (1986). The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell.* **47**, 333-348.
146. Mahdavi A., Ferreira L., Sundback C., Nichol J.W., Chan E.P., Carter D.J., Bettinger C.J., Patanavanich S., Chignozha L., Ben-Joseph E., Galakatos A., Pryor H., Pomerantseva I., Masiakos P.T., Faquin W., Zumbuehl A., Hong S., Borenstein J., Vacanti J., Langer R., Karp J.M. (2008). A biodegradable and biocompatible gecko-inspired tissue adhesive. *Proc Natl Acad Sci.* **7**, 2307-2312.
147. Maltezou H.C., Papa A. (2010). Crimean-Congo hemorrhagic fever: risk for emergence of new endemic foci in Europe? *Travel Med Infect Dis.* **8** (3), 139-43.
148. Mattila P.K., Lappalainen P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **9**, 446-454.
149. McJunkin J.E., de los Reyes E.C., Irazuzta J.E., Caceres M.J., Khan R.R., Minnich L, L., Fu K.D., Lovett G.D., Tsai T. Thompson A. (2001). La Crosse encephalitis in children. *N Engl J Med.* **344**, 801-807.
150. Mackenzie, J. (2005). Wrapping things up about virus RNA replication. *Traffic.* **6**, 967-977.

151. McNaught K.S, Shashidharan P., Perl D.P, Jenner P., Olanow C.W. (2002). Aggresome-related biogenesis of Lewy bodies. *Eur J Neurosci*. **16**, 2136-2148.
152. McRae R., Laj B., Fahrni C.J. (2006). Correlative microXRF and optical immunofluorescence Microscopy of adherent cells labelled with ultrasmall gold particles. *J Struct. Biol.* **155**, 22-29.
153. Miller S., Krijnse-Locker J. (2008). Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol.* **6**, 363-374.
154. Morimoto N., Raphael M.R., Nygren A., Brownell E.W. (2002). Excess plasma membrane and effects of ionic amphipaths on mechanics of outer hair cell lateral wall. *Am J Physiol Cell Physiol.* **282**, 1076-1086.
155. Morrill, J.C., McClain D.J. (1996). Epidemiology and pathogenesis of the Rift Valley and other Phleovirus. En *The Viruses* (ed H. Fraenkel-Corat y R.R. Wagner) pg 281-293. Olebum Press, New York and London.
156. Murphy F.A., Harrinson A.K., Whitfield S.G. (1974). Bunyaviridae: Morphologic and morphogenetic similarities of Bunyamwera serologic supergroup viruses, and several other arthropod-borne viruses. *Intervirology.* **1** (4), 297-316.
157. Murti K.G., Goorha R., Klymkowsky M.W. (1988). A functional role for intermediate filaments in the formation of frog virus 3 assembly sites. *Virology.* **162**, 264-269.
158. Nagy P.D. (2008). Yeast as a Model Host to Explore Plant Virus-Host Interactions. *Annu Rev Phytopathol.* **46**, 217-42.
159. Nakitare G.W., Elliott R.M. (1993). Expression of the Bunyamwera virus M genome segment and intracellular localization of NSm. *Virology.* **195**, 511-520.
160. Nasci R.S., Moore C.G., Biggerstaff B.J., Panella N.A., Liu H.Q., Karabatsos N., Davis B.S., Brannon E.S. (2000). La Crosse encephalitis virus habitat associations in Nicholas County, West Virginia. *J Med Entomol.* **37** (4), 559-567.
161. Nédellec P., Vicart P., Laurent-Winter C., Martinat C., Prévost M.C., Brahic M. (1998). Interaction of Theiler's virus with intermediate filaments of infected cells. *J Virol.* **72** (12), 9553-9660.
162. Netherton C., Moffat K., Brooks E., Wileman T. (2007). A guide to viral inclusions, membrane rearrangements, factories, and viroplasm produced during virus replication. *Adv Virus Res.* **70**, 101-82.
163. Neumann G., Feldmann H., Watanabe S., Lukashevich I., Kawaoka Y. (2002). Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture. *J Virol.* **76** (1), 406-10.
164. Newton S.R., Short J.N., Dalgarno L. (1980). Bunyamwera Virus Replication in Cultured *Aedes albopictus* (Mosquito) Cells: Establishment of a Persistent Viral Infection. *J Virol.* **38** (3), 1015-1024.
165. Ngo K.A., Maffei J.G., Dupuis A.P., Kauffman E.B., Backenson P.B., Kramer L.D. (2006). Isolation fon Bunyamwera serogroup (Bunyaviridae, Orthobunyavirus) in New York state. *J Med Entomol.* **45** (5), 1004-1009.
166. Nichol S.T., Beaty B., Elliott R.M., Goldbach R., Plyusnin A., Schmaljohn A.R., Tesh R.B. (2005). Bunyaviridae, en: *Virus Taxonomy*. Editores: Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. y Ball, L. A. Amsterdam: Elsevier, pg. 695-716. In C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball (ed.), *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier/Academia Press, London, United Kingdom.
167. Nichol S.T. (2001). Bunyaviridae. En *Fields Virology*, 4th Edn, (D.M. Knipe y P. Howley, eds), pg 1603-1633.
168. Niemann A., Takatsuki A., Elsasser H.P. (2000). The lysosomotropic agent monodansylcadaverine also acts as a solvent polarity probe. *J Histochem Cytochem.* **48**, 251-258.
169. Novoa R.R., Calderita G., Cabezas P., Elliott R.M., Risco C. (2005b). Key Golgi factors for structural and functional maturation of bunyamwera virus. *J Virol.* **79**, 10852-10863.
170. Novoa, R.R., Calderita G., Arranz R., Fontana J., Granzow H., Risco C. (2005a). Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol Cell.* **97**, 147-172.
171. Oldak M., Smola-Hess S., Maksym R. (2006). Integrin beta4, keratinocytes and papillomavirus infection. *Int J Mol Med.* **17**, 195-202.
172. Osborne J.C., Elliott R.M. (2000). RNA binding properties of bunyamwera virus nucleocapsid protein and selective binding to an element in the 5' terminus of the negative-sense S segment. *J Virol.* **74**, 9946-9952.
173. Overby A.K., Pettersson R.F., Grünwald K., Huiskonen J.T. (2008). Insights into Bunyavirus architecture from electron cryotomography of Uukuniemi virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105** (7), 2375-239.
174. Owens R.J., Compans R.W. (1989). Expression of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein is restricted to basolateral surfaces of polarized epithelial cells. *J. Virol.* **63**, 978-982.
175. Patton J.T. (editor) (2008). *Segmented Double stranded RNA viruses. Structure and molecular biology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
176. Pearson H. (2008). 'Virophage' suggests viruses are alive. *Nature.* **454**, 677.
177. Peattie A.M, Majidi C, Corder A., Full R. (2007). Ancestrally high elastic modulus of gecko setal b-keratin. *J Soc Interface.* **4**, 1071-1076.

178. Perry S.W., Norman J.P., Litzburg A., Zhang D., Dewhust S., Gelbard H.A. (2005). HIV-1 transactivator of transcription protein induces mitochondrial hyperpolarization and synaptic stress to apoptosis. *J Immunol.* **174**, 4333-44.
179. Pesonen M., Kuismanen E., Pettersson R.F. (1982). Monosaccharide sequence of protein bound glycans of Uukuniemi virus. *J Virol.* **41**, 390-400.
180. Petterson R.F., Melin L. (1996). Synthesis, assembly, and intracellular transport of bunyaviridae membrane proteins, p159-188. En R.M. Elliot (ed). *The Bunyaviridae*. Plenum Press, Inc., New York, NY.
181. Plassmeyer M.L., Soldan S.S., Stachelek K.M., Martin-Garcia J., Gonzalez-Scarano F. (2005). California serogroup Gc (G1) glycoprotein is the principal determinant of pH-dependent cell fusion and entry. *Virology.* **338**, 121-132.
182. Ploubidou A., Moreau V., Ashman K., Reckmann I., Gonzalez C., Way M. (2000). Vaccinia virus infection disrupts microtubule organization and centrosome function. *EMBO J.* **19**, 3932-3944.
183. Polishchuk R.S., Mironov A.A. (2001). Correlative video light/electron microscopy. *Current Protocol Cell Biol.* **4**, 4-8.
184. Pollitt E., Zhao J., Muscat P., Elliott R.M. (2005). Characterization of Maguari orthobunyavirus mutants suggests the nonstructural protein NSm is not essential for growth in tissue culture. *Virology.* **348** (1), 224-232.
185. Popper S., Fadel M.P., Opas, M. (2007). Dissecting focal adhesions in cells differentially expressing calreticulin; a microcopy study. *Biol.Cell.* **99**, 398-402.
186. Porterfield J.S., Casals J., Chumakov M.P., Gaidamovich S.Y., Hannoun C., Holmes I.H., Horzinek M.C., Musgay M., Russell P.K. (1975). Bunyaviruses and Bunyaviridae. *Intervirology.* **6**, 13-24.
187. Rai S.K., Micales B.K., Wu M.S., Cheung D.S., Pugh T.D., Lyons G., Salvato M.S. (1997). Timed appearance of lymphocytic choriomeningitis virus after gastric inoculation of mice. *Am J Pathol.* **151**, 633-639.
188. Ramanathan N. H., Jonsson B.C. (2008). New and Old World Hantaviruses differentially utilize host cytoskeletal components during their life cycles. *Virology.* **374**, 138-150.
189. Ramanathan H.N., Chung D.H., Plane S.J., Sztul E., Chu Y.K., Gutteri M.C., McDowell M., Ali G., Jonsson C.B. (2007). Dynein-dependent transport of the hantaan virus nucleocapsid protein to the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *J Virol.* **81** (16), 8634-8647.
190. Raucher D., Sheetz M.P. (2000a). Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *J Cell Biol.* **148**, 127-136.
191. Raucher D.T., Stauffer W., Chen K., Shen S., Guo J.D., York M., Sheetz P., Meyer T. (2000b). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasmamembrane adhesion. *Cell.* **100**, 221-228.
192. Raucher D., Sheetz M.P. (1999). Characteristics of a membrane reservoir buffering membrane tension. *Biophys J.* **77**, 1992-2002.
193. Ravkov E.V., Nichol S.T., Peters C.J., Compans R.W. (1998). Role of actin microfilaments in Black Creek Canal virus morphogenesis. *J. Virol.* **72**, 2865-2870.
194. Ravkov E.V., Nichol S.T., Compans R.W. (1997). Polarized entry and release in epithelial cells of Black Creek Canal virus, a New World Hantavirus. *J Virol.* **71**, 1147-1154.
195. Rietdorf J., Ploubidou A., Reckmann I., Holmström A., Frischknecht F., Zettl M., Zimmermann T., Wa M. (2001). Kinesin-dependent movement on microtubules precedes actin-based motility of vaccinia virus. *Nature Cell Biology.* **3**, 992-1000.
196. Risco C., Rodríguez J.R., López-Iglesias C., Carrascosa J.L., Esteban M., Rodríguez D. (2002). Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment membranes and vimentin filaments participate in vaccinia virus assembly. *J Virol.* **76** (4), 1839-1855.
197. Roizman B. (1990). Multiplication of viruses: an overview. En *Fields Virology*, vol. 1, pg. 87-94. Edited B. N. Fields & D. N. Knipe. New York: Raven Press.
198. Robinson J.M., Takizawa T., Vandre D.D. (2000). Applications of gold cluster compounds in immunocytochemistry and correlative microscopy comparison with colloidal gold. *J Microsc.* **199**, 163-179.
199. Rodriguez-Boulan E., Powell S.K. (1992). Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu Rev Cell Biol.* **8**, 395-427.
200. Rossen J.W., de Beer R., Godeke G.J., Raamsman M.J., Horzinek M.C., Vennema H., Rottier P.J. (1998). The viral spike protein is not involved in the polarized sorting of coronaviruses in epithelial cells. *J Virol.* **72** (1), 497-503.
201. Roy P. (2008). Structure and Function of Bluetongue Virus and its Proteins. *Segmented Double-stranded RNA Viruses: Structure and Molecular Biology*. Caister Academic Press.
202. Rubial R., Ernst V. (1965). The structure of the digital setae lizards. *J. Morphol.* **117**, 271-294.
203. Rustom A., Saffrich R., Markovic I., Walther P., Gerdes H.H. (2004). Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science.* **303**, 1007-1010.
204. Rwambo P.M., Shaw M.K., Rurangirwa F.R., DeMartini J.C. (1996). Ultrastructural studies on the replication and morphogenesis of Nairobi sheep disease virus, a Nairovirus. *Arch Virol.* **141**, 1479-1492.

205. Salanueva I.J., Novoa R.R., Cabezas P., López-Iglesias C., Carrascosa J.L., Elliot R.M., Risco C. (2003). Polymorphism and structural maturation of bunyamwera virus in Golgi and post-Golgi compartments. *J Virol.* **77**, 139-73.
206. Salonen A., Ahola T., Kaariainen L. (2005). Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **285**, 139-173.
207. Samuel E.Ch. (2005). Virus-Host Interaction Minireview Series: Human Immunodeficiency Virus, Hepatitis C Virus, and Influenza Virus. *J Biol Chem.* **281** (13), 8305-8307.
208. Schmaljohn, C.S., Nichol S.T. (2007). Bunyaviridae. En *Fields Virology*, 5ª edición. Editores: Knipe, D. H. y Howley, P. H. Lippincott, Williams y Wilkins, a Wolters KluwerBusiness. Filadelfia, Estados Unidos, pg. 1741-1789.
209. Schmaljohn C., Hooper W.J. (2001). Bunyaviridae: The viruses and their replication, pg. 1581-1602. In *Knipe D.M et al., (ed.) Fields Virology 4th ed.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
210. Schmaljohn C.S. (1996). Bunyaviridae: The Viruses and Their Replication. En *Fields B.N., Knipe D.H., Howley P.M. Fields Virology.* Lippincott-Raven Publisher. 1996; 3 edition. Vol **1**, pg 1447-1465.
211. Schoumache M., Goldman R.D., Louvard D., Vignjevic D.M. (2010). Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia. *J Cell Biol.* **189** (3), 541-56.
212. Schwartz M.A., Ginsberg, M.H. (2002). Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol.* **4**, E65-E68.
213. Sharpe A.H., Chen L.B., Fields B. (1982). The interaction of mammalian reoviruses with the cytoskeleton of monkey kidney CV-1 cells. *Virology.* **120**, 399-411.
214. Sherman M.B., Freiberg A.N., Holbrook M.R., Watowich S.J. (2009). Single-particle cryoelectron microscopy of Rift Valley fever virus. *Virology.* **387** (1), 11-15.
215. Sherer N.M., Mothes W. (2008). Cytonemes and tunneling nanotubes in cell-cell communication and viral pathogenesis. *Trends Cell Biol.* **18**, 414-420.
216. Shi X., van Mierlo J.T., French A., Elliott R.M. (2010). Visualizing the replication cycle of bunyamwera orthobunyavirus expressing fluorescent protein-tagged Gc glycoprotein. *J Virol.* **84** (17), 8460-8469.
217. Shi X., Elliott R.M. (2009). Generation and analysis of recombinant Bunyamwera orthobunyaviruses expressing V5 epitope-tagged L proteins. *J Gen Virol.* **90**, 297-306.
218. Shi X., Kohl A., Li P., Elliott R.M. (2007). Role of the cytoplasmic tail domains of Bunyamwera orthobunyavirus glycoproteins Gn and Gc in virus assembly and morphogenesis. *J Virol.* **81**, 10151-10160.
219. Shi X., Kohl A., Léonard V.H., Li P., McLees A., Elliott R.M. (2006). Requirement of the N-terminal region of orthobunyavirus nonstructural protein NSm for virus assembly and morphogenesis. *J Virol.* **80** (16), 8089-99.
220. Shi X., Brauburger K., Elliott R.M. (2005). Role of N-linked glycans on bunyamwera virus glycoproteins in intracellular trafficking, protein folding, and virus infectivity. *J Virol.* **79**, 13725-13734.
221. Shi X., Lappin D.F., Elliot R.M. (2004). Mapping the Golgi targeting and retention signal of Bunyamwera virus glycoproteins. *J Virol.* **78**, 10793-10802.
222. Shi Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* **9**, 459-470.
223. Sidwell R.W., Smeets D.F. (2003). Viruses of the Bunya- and Togaviridae families: potential as bioterrorism agents and means of control. *Antiviral Res.* **57**, 101-11.
224. Simon K.O., Whitaker-Dowling P.A., Youngner J.S., Widnell C.C. (1990). Sequential disassembly of the cytoskeleton in BHK21 cells infected with vesicular stomatitis virus. *Virology.* **177**, 289-297.
225. Simons K., van Meer G. (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**, 6197-6202.
226. Small J.V., Stradal T., Vignat E., Rottner K. (2002). The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* **12** (3), 112-120.
227. Smithburn K.C. (1949). Rift Valley fever; the neurotropic adaptation of the virus and the experimental use of this modified virus as a vaccine. *Br J Exp Pathol.* **30** (1), 1-16.
228. Smithburn K.C., Haddow A.J., Mahaffy A.F. (1946). A Neurotropic Virus Isolated from Aedes Mosquitoes Caught in the Semliki Forest. *Am J Trop Med.* **1** (26), 189-208.
229. Sobue K. (1990). Involvement of the membrane cytoskeletal proteins and the src gene product in growth cone adhesion and movement. *Neurosci Res Suppl.* **13**, S80-91.
230. Soldan S.S., González-Scarano. F. (2005). Emerging infections diseases: The Bunyaviridae. *J Neurovirol.* **11**, 412-423.
231. Sol-Foulon N., Sourisseau M., Porrot F., Thoulouze M.I., Trouillet C., Nobile C., Blanchet F., di Bartolo V., Noraz N., Taylor N., Alcover A., Hivroz C., Schwartz O. (2007). ZAP-70 kinase regulates HIV cell-to-cell spread and virological synapse formation. *EMBO J.* **26**, 516.
232. Southam C.M., Shipkey F., Babcock V.L., Bailey R., Erlandson R.A. (1963). Growth of West Nile and Guaroa Viruses in Tissue Culture. *J Bacteriol.* **88** (1), 187-199.
233. Sowinski S., Jolly C., Berninghausen O., Purbhoo M.A., Chauveau A., Köhler K., Oddos S., Eissmann P., Brodsky M.P., Hopkins C., Önfelt B., Sattentau Q., Davis D.M. (2008). Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nature Cell Biology.* **10** (2), 211-219.

234. **Spiro R.G.** (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*. **12**, 43-56.
235. **Striker J., Sabass B., Schwarz U.S., Gardel M.L.** (2010). Optimization of traction force microscopy for micron-sized focal adhesions. *J Phys: Condens Matter*. **22** (19), 194104.
236. **Stroikin Y., Dalen H., Löff S., Terman A.** (2004). Inhibition of autophagy with 3-methyladenine results in impaired turnover of lysosomes and accumulation of lipofuscin-like material. *Eur J Cell Biol*. **83** (10), 583-590.
237. **Sun W., Neuzil P., Kustandi T. S., Oh S., Samper V.D.** (2005). The nature of the gecko lizard adhesive force. *Biophys J*. **89**, L14-L16.
238. **Swaneped R., Coetzer J.A.W.** (2004). Rift Valley fever in Infectious Diseases of Livestock (ed J.A.W. Coetzer y R.C. Tustin) vol 2 Oxford University Press. Cape Town, pg 1037-1070.
239. **Takizawa T., Robinson J.M.** (2003). Ultrathin cryosections an important tool for immunofluorescence and correlative microscopy. *J Histochem Cytochem*. **51**, 707-714.
240. **Tanaka J., Watanabe T., Nakamura N., Sobue K.** (1993). Morphological and biochemical analyses of contractile proteins (actin, myosin, caldesmon and tropomyosin) in normal and transformed cells. *J Cell Sci*. **104**, 595-606.
241. **Tarone G., Cirillo D., Giancotti F.G., Comoglio P.M., Marchisio P.C.** (1985). Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts adhere primarily at discrete protrusions of the ventral membrane called podosomes. *Exp Cell Res*. **159**, 141-157.
242. **Tesh R.B., Gubler D.J.** (1975). Laboratory studies of transovarial transmission of La Crosse and other arboviruses by *Aedes albopictus* and *Culex fatigans*. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. **24**, 876-880.
243. **Titushkin I., Cho M.** (2006). Distinct Membrane Mechanical Properties of Human Mesenchymal Stem Cells Determined Using Laser Optical Tweezers. *Biophys J*. **90**, 2582-2591.
244. **Tsukita S., Furuse M., Itoh M.** (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2** (4), 285-293.
245. **Traavik T., Mehl R., Wiger R.** (1985). Mosquito-borne arbovirus in Norway: further isolations and detection of antibodies to California encephalitis viruses in human, sheep, and wildlife area. *J Hyg Camb*. **94**, 111-122.
246. **Vapalahti O., Mustonen J., Lundkvist A., Henttonen H., Plyusnin A., Vaheri A.** (2003). Hantavirus infections in Europe. *The Lancet Infect Dis*. **3**, 653-752.
247. **Vasiliver-Shamis G., Cho M.W., Hioe C.E., Dustin M.L.** (2009). Human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120-induced partial T-cell receptor signaling creates an F-actin-depleted zone in the virological synapse. *J Virol*. **83** (21), 11341-11355.
248. **van Driel L.F., Knoops K., Koster A. J., Valentijn J.A.** (2008). Fluorescent labeling of resin-embedded sections for correlative electron microscopy using tomography-based contrast enhancement. *J Struct Biol*. **161**, 372-383.
249. **van der Heide P., Xu X.P., Marsh B.J., Hanein D., Volkmann N.** (2007). Efficient automatic noise reduction of electron tomographic reconstructions based on iterative median filtering. *J Struct Biol*. **158** (2), 196-204.
250. **van Eijl H., Hollinshead M., Smith G.L.** (2000). The vaccinia virus A36R protein is a type Ib membrane protein present on intracellular but not extracellular enveloped particles. *Virology*. **271**, 26-36.
251. **van Regenmortel M. (ed.)** (2000). Introduction to the virus species in Virus Taxonomy, In *Virus Taxonomy*, pg. 3-16.
252. **Velasco A., Hidalgo J.** (1987). Light and electron microscopical localization of Concanavalin A lectin binding sites in rat epiphyseal chondrocytes. *Histochem J*. **19**, 7-14.
253. **Waite, J.H.** (2002). Adhesion a la moule. *Integr. Comp Biol*. **42**, 1172-1180.
254. **Waite J.H., Qin X.X.** (2001). Polyphenolic phosphoprotein from the adhesive pads of the common mussel. *Biochemistry*. **40**, 2887-2893.
255. **Wang X., Veruki M.L., Bukoreshtliev N.V., Hartveit E., Gerdes H.H.** (2010). Animal cells connected by nanotubes can be electrically coupled through interposed gap-junction channels. *Proc Natl Acad Sci*. **107** (40), 17194-17199.
256. **Wang H., Strandin T., Hepojoki J., Lankinen H., Vaheri A.** (2009). Degradation and aggresome formation of the Gn tail of the apathogenic Tula Hantavirus. *J Gen Virol*. **90** (12), 2995-3001.
257. **Ward B.M., Moss B.** (2001). Vaccinia virus intracellular movement is associated with microtubules and independent of actin tails. *J Virol*. **75** (23), 11651-63.
258. **Weaver A.M., Karginov A.V., Kinley A.W., Weed S.A., Li Y., Parsons J.T., Cooper J.A.** (2001). Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr Biol*. **11** (5), 370-374.
259. **Weber F., Dunn E.F., Bridgen A., Elliott R.M.** (2001). The Bunyamwera virus nonstructural protein NSs inhibits viral RNA synthesis in a minireplicon system. *Virology*. **281**, 67-74.
260. **Webster R.G., Granoff A.** (1994). *Encyclopedia of Virology*. Academic Press. **1**, 186-196.
261. **Wilde A., Reaves B., Banting G.** (1992). Epitope mapping of two isoforms of a *trans*-Golgi network specific integral membrane protein TGN38/41. *FEBS Lett*. **313** (3), 235-238.
262. **Wileman T.** (2006). Aggresomes and autophagy generate sites for virus replication. *Science*. **312**, 875-878.

263. **Yandoko N.E., Grimaldo S., Finance C., Le Faou A., Rihn, B.H.** (2007). Molecular characterization of African orthobunyaviruses. *J Gen Virol.* **88**, 1764-1766.
264. **Yamada M.K., Miyamoto S.** (1995). Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Opin Cell Biol.* **7**, 681-689.
265. **Yeo N.K., Jang Y.J.** (2010). Rhinovirus infection-induced alteration of tight junction and adherens junction components in human nasal epithelial cells. *Laryngoscope.* **120** (2), 346-352.
266. **Young D.F., Andrejeva L., Livingstone A., Goodbourn S., Lamb R.A., Collins P.L., Elliott R.M., Randall R.E.** Virus Replication in engineered Human Cells that do not respond to interferons. *J Virol.* **77** (3), 2174-2181.
267. **Yu F.L.** (1980). Selective inhibition of rat liver nuclear RNA polymerase II by actinomycin D *in vivo*. *Carcinogenesis.* **1** (7), 577-581.
268. **Zimmer G., Zimmer K.P., Trotz I., Herrler G.** (2002). Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein Does Not Determine the Site of Virus Release in Polarized Epithelial Cells. *J Virol.* **76** (8), 4103-4107.